

Zur Strahlenreaktion des
NAD⁺-NADH-Systems in vitro und
in Mitochondrien in Abhängigkeit
vom metabolischen Zustand

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
der Justus Liebig-Universität Gießen
Fachbereich Physik

vorgelegt von
Flavio Ojeda-Schwencke
aus Osorno/Chile

Gießen 1972

Zur Strahlenreaktion des
NAD⁺-NADH-Systems in vitro und
in Mitochondrien in Abhängigkeit
vom metabolischen Zustand

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
der Justus Liebig-Universität Gießen
Fachbereich Physik

vorgelegt von

Flavio Ojeda-Schwencke

aus Osorno/Chile

Gießen 1972



D 26

Dekan: Prof. Dr. A. Scharmann

I. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Schraub

II. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Gundlach

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Sept. 1972

Gedruckt mit Unterstützung des Deutschen Akademischen
Austauschdienstes

1.	Introduction	1
2.	General and Historical	2
3.	Classification of the Standardization	3
4.	General Principles of Standardization	4
5.	Meiner Frau	5
6.	General Principles of Standardization	6
7.	General Principles of Standardization	7
8.	General Principles of Standardization	8
9.	General Principles of Standardization	9
10.	General Principles of Standardization	10
11.	General Principles of Standardization	11
12.	General Principles of Standardization	12
13.	General Principles of Standardization	13
14.	General Principles of Standardization	14
15.	General Principles of Standardization	15
16.	General Principles of Standardization	16
17.	General Principles of Standardization	17
18.	General Principles of Standardization	18
19.	General Principles of Standardization	19
20.	General Principles of Standardization	20
21.	General Principles of Standardization	21
22.	General Principles of Standardization	22
23.	General Principles of Standardization	23
24.	General Principles of Standardization	24
25.	General Principles of Standardization	25
26.	General Principles of Standardization	26
27.	General Principles of Standardization	27
28.	General Principles of Standardization	28
29.	General Principles of Standardization	29
30.	General Principles of Standardization	30
31.	General Principles of Standardization	31
32.	General Principles of Standardization	32
33.	General Principles of Standardization	33
34.	General Principles of Standardization	34
35.	General Principles of Standardization	35
36.	General Principles of Standardization	36
37.	General Principles of Standardization	37
38.	General Principles of Standardization	38
39.	General Principles of Standardization	39
40.	General Principles of Standardization	40
41.	General Principles of Standardization	41
42.	General Principles of Standardization	42
43.	General Principles of Standardization	43
44.	General Principles of Standardization	44
45.	General Principles of Standardization	45
46.	General Principles of Standardization	46
47.	General Principles of Standardization	47
48.	General Principles of Standardization	48
49.	General Principles of Standardization	49
50.	General Principles of Standardization	50

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	6
2.1. Präparation der Mitochondrien	6
2.2. Messung des O ₂ -Verbrauches	7
2.3. Messung der Lichtstreuung an Mitochondrien	8
2.4. Qualitative Bestimmung des Redox-Zustandes der Pyridinnukleotide in Mitochondrien	8
2.5. Bestimmung von NAD ⁺⁺ und NADH	8
2.6. Bestrahlung mit Röntgenstrahlen	12
2.7. -Bestrahlung	13
2.8. Versuchsanordnung zur Bestrahlung von NADH-Lösungen	13
3. Vorbemerkung zu den Mitochondrien	15
4. Ergebnisse	21
4.1.1. Strahlenreaktionen während Röntgen- Bestrahlung	21
4.1.2. Strahlenreaktionen nach Röntgen- Bestrahlung	21
4.1.3. Strahlenreaktionen nach -Bestrahlung	26
4.2. Strahleneffekte auf das Redox-System NAD ⁺ -NADH	36
4.2.1. Bestrahlung in Pufferlösung	36
4.2.2. Bestrahlung in reinem Wasser	41
4.2.3. Einfluß von Cystein	45

5.	Diskussion	49
5.1.	Allgemeines	49
5.2.	Überlegungen zum O_2 -Effekt	53
6.	Zusammenfassung	63
7.	Literaturverzeichnis	65

1. EINLEITUNG

Die Antwort biologischer Systeme auf die Applikation ionisierender Strahlung wird durch den Energieabsorptionsakt und die sich hieraus entwickelnden Folgereaktionen bestimmt.

Da es nicht gleichgültig ist, welche Moleküle durch die Bestrahlung primär verändert werden, sucht man die für den jeweilig zu studierenden Effekt relativ kritischsten Moleküle oder Zellstrukturen herauszufinden (Targets) (direkter Effekt).

Nimmt man die Teilungsfähigkeit von isolierten Zellen als biologisches Kriterium der Strahlenwirkung (Koloniebildungsvermögen, Zeitpunkt der ersten Teilung), so kann man unmittelbar nach Bestrahlung im allgemeinen keine biochemische Veränderung feststellen, obwohl später ein Effekt zu beobachten ist. Deswegen müssen das oder die (primären) Targets die Fähigkeit besitzen, den Effekt zu verstärken. Als erstes bietet sich unter den biologischen Strukturen die DNS an, die auch am häufigsten als das (primäre) Target angesprochen wird.

Für die Reaktion des Systems auf die Bestrahlung kann aber die Absorption bei kleineren Molekülen durch deren Folgereaktionen eine wesentliche Rolle spielen (indirekter Effekt). So fanden Sanner und Phil (1969) (63) bei Bakterien aus Versuchen mit tiefen Temperaturen und hohen Konzentrationen an Radikalfängern, daß etwa die Hälfte des Schadens bei Anoxie aus direkten Treffern (direkter Effekt) mit irgendeinem Target und die andere Hälfte auf die Reaktion der Wasserradikale

(hauptsächlich $\text{OH}^{\bullet}$) mit Target-Molekülen (indirekter Effekt) zurückzuführen ist.

Es ist plausibel, daß bei einer Änderung der unmittelbaren Umgebung der gebildeten Wasserradikale durch veränderte physiologische Bedingungen auch die durch diese in Gang gesetzten Reaktionen beeinflußt werden. Für die direkten Targets gilt die gleiche Überlegung, wobei noch hinzukommt, daß sich auch diese selbst (chemisch und damit auch strukturell) physiologisch ändern können (z.B. im Zellzyklus).

Mindestens seit den Versuchen von Elkind und Sutton (1960) (22) an Goldhamsterzellen ist es klar, daß Zellen fähig sind, die Manifestation des Strahlenschadens zu beeinflussen (Reparatur). Das Verhindern des Auftretens (Reparatur) des Strahlenschadens scheint eine Energiequelle zu benötigen (52,53,54, 33,37,38,41,55). Dalrympe et. al. (20,21) fanden aber mit dem "overall inhibitor" DNP (Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung), daß Split Dose repair (bypass of damage) nicht beeinflußt wurde.

Elkind (23) kommt in einem Review-Artikel über die LET-Anhängigkeit der Reparatur von Strahlenschäden zu dem Schluß, daß zumindest nicht ausgeschlossen werden kann, daß außer der DNS noch andere Targets für das Überleben bestrahlter Zellen mitentscheidend sind.

Cramp W.A. (18) meint, aus Versuchen mit Zusatz von Chemikalien, daß DNS nicht das einzige oder gar nicht das wichtigste Target ist.

Im wesentlichen aus Experimenten über den Sauerstoffeffekt hat nun T. Alper (4) vorgeschlagen, daß auch Membranstrukturen in der Zelle mit als wichtige Targets fungieren könnten.

Die Annahme, daß Membranen strahlenbiologisch wichtig sind, wird durch die Experimente von Shenoy et. al. (1968) (67) sehr gestützt, die bei Bestrahlung von Bakterien in Anwesenheit von KJ Iodierung der Zellmembran gefunden haben.

Die gravierenden physiologischen Veränderungen, die SH-haltige Schutzsubstanzen an den biologischen Membranen verursachen (11,27), stützen diese Annahme weiterhin. Bacq und Alexander (8) haben als mögliche Beteiligungsart der Membran die Hypothese des "Enzymes release" aufgestellt.

Als weitere Möglichkeit der Beteiligung der Membranen an der Entwicklung des Strahlenschadens ist noch die Beeinflussung des Elektrolythaushaltes zu betrachten, wobei eine Aktivierung bzw. Hemmung von Enzymen auftreten kann.

Schon 1926 fanden Lehman und Wels (49) eine Beeinflussung des Na^+ - und K^+ -Haushaltes bei Erythrocyten durch ionisierende Strahlen. Der strahleninduzierte Kaliumverlust bei Erythrocyten ist wesentlich von der Inkubationstemperatur nach Bestrahlung abhängig (58), außerdem aber von der Anwesenheit von Glukose in dem Inkubationsmedium nach der Bestrahlung (58,69). Es erscheint wahrscheinlich, daß bei ausreichendem Energievorrat der Schaden reversibel ist. Die von Bresciani (12) parallel zur Permeabilitätsänderung gefundene Änderung der Na^+ - K^+ -ATPase-Aktivität deutet auf eine Hemmung des aktiven Transportes von Na^+ und K^+ hin.

Das Austreten von K^+ nach Bestrahlung ist auch für Ehrlich ascites Tumorzellen gemessen worden (28,35).

Aus der erwähnten Möglichkeit der Energieabhängigkeit der "Reparaturvorgänge" läßt sich eine Beteiligung der Mitochondrien an diesem Prozeß vermuten, nämlich als wichtigstes energielieferndes System bei aeroben Eukaryonten.

Noch zwei weitere Eigenschaften lassen das Studium dieser Organellen in Bezug auf ihre Beteiligung bei der Strahlenreaktion interessant erscheinen. Es ist dies erstens ihre Eigenschaft als Lieferer "reduzierender Potentiale" (s. Krebs H.A. (44,45)), welche zumindest unter bestimmten physiologischen Bedingungen in Muskel und Leber gefordert werden muß. Da intakte Mitochondrien für NADH praktisch undurchlässig sind, erfolgt der Austritt reduzierender Potentiale durch andere reduzierte Substanzen, die NADH im Cytoplasma erzeugen können. Ein Zusammenbrechen der Permeabilitätsschranke für NADH oder NAD^+ würde schwerwiegende Störungen in der Zelle bewirken, da die Redox-Zustände des NAD^+ - NADH innerhalb und außerhalb der Mitochondrien sehr unterschiedlich sind.

Als zweites ist noch die Fähigkeit dieser Organellen von Bedeutung, an ihren Membranen Konzentrationsgradienten kleinerer und größerer Moleküle aufzubauen und so zum Beispiel den Elektrolythaushalt der Zelle zu beeinflussen.

In dieser Beziehung sind die Versuche von Alexander (2) interessant, der ein EDTA-sensibles "repair-Enzym" bei *Micrococcus radiodurans* gefunden hat. Es ist denkbar, daß die Wirkung

des EDTA durch dessen Eigenschaft als Chelatbildner z.B. mit Ca^{++} bedingt ist. Wenn ein solches "repair-System" auch bei Eukaryonten existiert, ist die Wirkung der Mitochondrien auf dasselbe durch Aufnahme von Ca^{++} -Ionen in die Mitochondrien durchaus denkbar, weil Mitochondrien Ca^{++} sehr gut aufnehmen können (51) und so dessen Haushalt in der Zelle beeinflussen. Die Strahlenwirkung auf das Erhalten von K^{+} - und Ca^{++} -Konzentrationsgradienten an den Mitochondrienmembranen ist von Wills (72) in Suspension studiert worden. Er erhielt bei 5 krd eine merkliche Schädigung der K^{+} Retention; bei 10 krd konnten sie eine Beeinträchtigung des Ca^{++} -Transportes feststellen.

Die Strahlensensibilität des Elektronentransportsystems und der oxydativen Phosphorylierung scheint kleiner als die der Permeabilität zu sein (17).

Da aber der Ca^{++} -Transport in die Mitochondrien sehr eng mit der oxydativen Phosphorylierung verknüpft ist (51), und diese wiederum an die innere Membran der Mitochondrien gebunden ist, ist es möglich, daß der Unterschied in der Sensibilität der Permeabilität, verglichen mit der oxydativen Phosphorylierung, durch Unterschiede in der Behandlung der Mitochondrien zu erklären ist, was auch durch unterschiedliche Angaben über die Strahlenempfindlichkeit der oxydativen Phosphorylierung in der Literatur bestärkt wird.

Aus diesen Gründen erschien es uns interessant, den Einfluß des physiologischen Zustandes der Mitochondrien unter und nach der Bestrahlung zu untersuchen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Präparation der Mitochondrien

Die Mitochondrien wurden aus der Leber von weiblichen Wistar-Ratten im Gewicht von 120 - 190 g isoliert. Die Ratten wurden mit Altromin R 10-Futter und Wasser ad. libitum gehalten. Die Präparation der Mitochondrien erfolgte nach der Methode von W.C. Schneider (66), wie sie von D. Johnson und H. Lardy (39) beschrieben wird.

Das Extraktionsmedium bestand aus einer 0,25 molaren Saccharose-Lösung, die mit 1 mM Trishydroxymethylaminomethan-HCl-Puffer (Tris-Puffer) auf pH 7,4 eingestellt wurde. Das benutzte Wasser war zweimal destilliertes pyrogen-freies Wasser aus einer Duran-50-Glas-Destille von Schott und Gen. Für alle weiteren Lösungen wurde ebenfalls dieses Wasser benutzt.

Die Präparation ging im einzelnen so vonstatten: Die Ratte wird mit Nackenschlag betäubt, sofort dekapitiert und unter dem kalten Wasserstrahl entblutet. Anschließend wird die Leber herausoperiert und in eiskaltem Extraktionsmedium gekühlt. Die weitere Extraktion verläuft bei 0 - 4°C. Die einzelnen Lappen werden, ohne die Gallenblase zu beschädigen, abgetrennt und in ein anderes Gefäß mit Extraktionsmedium kleingeschnitten. Um das restliche Blut zu entfernen, wird die kleingeschnittene Leber zwei- bis dreimal mit Extraktionsmedium gewaschen. Anschließend wird das Gewebe in einen 30 ml Potter-Elvehjem-Homogenisator aus Glas mit Teflonkolben gegeben und im Eiswasserbad homogenisiert.

Das Homogenisat wird dann auf 60 ml verdünnt und in einer Sorvall-Kühlzentrifuge (Modell RC2-B) bei $0 - 2^{\circ}\text{C}$ 10 Minuten lang bei 600 g abzentrifugiert, wobei Kerne, ganze Zellen, Gewebereste und auch einige Mitochondrien sedimentieren. Der Mitochondrien enthaltende Überstand wird im Eis-Wasser aufbewahrt. Das Sediment wird durch leichtes Homogenisieren wieder in 20 ml Extraktionsmedium aufgerührt und 10 Minuten bei 600 g abgeschleudert. Der Überstand wird mit dem ersten vereinigt und 5 Minuten bei 15000 g abzentrifugiert. Das Sediment enthält die Mitochondrien. Diese werden nun dreimal bei 15000 g gewaschen. Dann wird das Sediment in 3 ml Extraktionsmedium suspendiert. Wir nennen diese Suspension die Mitochondrien-Fraktion. Hier haben wir eine Proteinkonzentration von 40 - 50 mg/ml. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt mit der Biuret Methode nach Bücher et. al. und Weichselbaum (9).

2.2. Messung des O_2 -Verbrauchs

Die Bestimmung des O_2 -Verbrauchs erfolgte polarographisch mit einer Clark-Zelle der Fa. Rank Bros/Bottisham. Es ist eine stationäre Platin-Silbererelektrode, die mit gesättigter KCl-Lösung gefüllt und mit einer dünnen, etwa 13μ dicken Teflonschicht überzogen ist. Der Strom wird über einen Widerstand mit einem Metrawatt-Kompensationsschreiber registriert. Der Eigenverbrauch der Zelle ist für unsere Messungen vernachlässigbar klein (unter 1% der gesamten, in 3 ml luftgesättigtem Wasser enthaltenen O_2 -Menge pro Minute).

Zum Überprüfen der Nachdiffussion durch den Einfüllstutzen aus der Luft wurde der O_2 -Gehalt des in der Zelle vorhandenen Wassers strahlenchemisch durch Röntgen-Strahlen auf ca. 40% des Ausgangswertes reduziert und 10 Minuten lang registriert. Es war keine Änderung der Anzeige innerhalb $\pm 1\%$ festzustellen. Die Nachdiffussion ist also auch vernachlässigbar klein.

2.3. Messung der Lichtstreuung

Um mit der Atmung gleichzeitig die Lichtstreuung an den Mitochondrien messen zu können, wurde die Clark-Zelle durch Einbau zweier senkrecht zueinander stehender Quarzfenster modifiziert. Die Lichtstreuung wurde bei 546 nm gemessen (Abb. 1).

2.4. Qualitative Bestimmung des Redox-Zustandes der Pyridinnukleotide in Mitochondrien

Die kontinuierliche Registrierung des relativen Reduktionsgrades der Pyridinnukleotide wurde mit Hilfe der Fluoreszenz der reduzierten Pyridinnukleotide durchgeführt (14,15,60). Die Fluoreszenz wurde mit der 366 nm-Linie eines Hg-Hochdruckbrenners Q 600 der Firma Hanauer Quarzlampengesellschaft angeregt. Gemessen wurde die Emission bei 436 nm mit einem Photomultiplier. Der Winkel zwischen Anregungs- und Meßstrahl betrug 90 Grad. Die Messung wurde in einer 2 x 2 cm Quarzküvette bei Zimmertemperatur vorgenommen.

2.5. Bestimmung von NAD^+ und NADH

Vor und nach der Bestrahlung mit γ -Strahlen wurde das aus

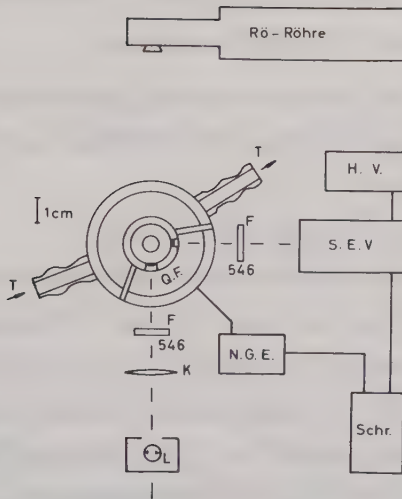


Abb. 1. Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur gleichzeitigen Registrierung der Lichtstreuung an Mitochondrien und deren Atmung unter Bestrahlung.

F = Filter 546 nm

H = Hochspannungsgerät für S.E.V.

K = Kollimator

L = Wasserstoffleuchte (H30DS Hanau Quarzlampen GmbH.

N.G.E. = Netzgerät für die Sauerstoff-Elektrode

Q.F. = Quarzfenster

Schr = Doppelschreiber

T = Temperierung, Ein- und Ausgang

den Mitochondrien in das Suspensionsmedium ausgetretene NAD^+ bestimmt. Hierfür wurde die Suspension 2 Minuten lang in einer Eppendorf-Zentrifuge bei Stufe 4 abzentrifugiert und der klare Überstand auf NAD^+ untersucht.

Bestimmung von NAD^+ erfolgte mit der von Estabrook (26) beschriebenen Methode. Hierbei wird das NAD^+ mit Hilfe der enzymatischen Reaktion



in NADH übergeführt. In der Reaktionsküvette werden 1,5 ml der Reaktionslösung, bestehend aus 0,2 M Glykokoll, 0,4 M Hydracynhydrat und 0,15 M Äthanol - mit KOH auf pH 9 gebracht-, mit 0,5 ml von der zu untersuchenden Lösung vermischt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 3, μg Alkoholdehydrogenase in Gang gesetzt. Die Bildung von NADH wurde mit Hilfe der für NADH charakteristischen Fluoreszenz verfolgt. Diese Messung erfolgte in einem Eppendorf-Photometer mit Fluorometereinsatz. Zur Kompensation der nicht spezifischen Grundfluoreszenz wurde eine von Estabrook und Maitra (25) beschriebene Schaltung (Abb. 2) angewandt. Registriert wurde die NADH-Fluoreszenz mit einem Metrawatt-Kompensationsschreiber. Die Anzeige wurde durch Zugabe definierter Mengen an NAD^+ geeicht. Angeregt wurde mit Licht der Wellenlänge 366 nm, und die Messung des Fluoreszenz-Lichtes erfolgte hinter einem Breitbandfilter von Eppendorf 420 - 3000 nm.

Die Bestimmung von NAD^+ in den radiochemischen Experimenten mit reinem NADH erfolgte mit den gleichen Methoden. Das NADH wurde durch enzymatische Oxydation zu NAD^+ über die Abnahme

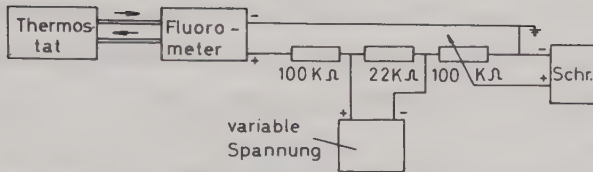


Abb. 2. Schematische Darstellung der Apparatur zur enzymatischen Bestimmung von NAD^+ und NADH mit der Kompensationsschaltung nach Estabrook und Maitra (25)

der Fluoreszenz bestimmt. Hierbei konnte die NADH-Konzentration zusätzlich durch die Abnahme der Absorption bei 340 nm (gemessen in einem Zeiss-Spektrophotometer PMQ 2) bestimmt werden. Hierzu wurde 0,5 ml Probe mit 2 ml des folgenden Reaktionsmediums vermischt: 0,1 molarer Orthophosphat-Puffer pH 7,4 und 33 millimolare Acetaldehyd-Lösung. Die Reaktion wurde wiederum mit ADH (6,ug) gestartet.

2.6. Bestrahlung mit Röntgen-Strahlen

Die Röntgenbestrahlungen erfolgten mit einer 150 kV Röntgen-Röhre der Firma Müller (Typ Möd 150) bei einem Betriebsstrom von 12 mA. Als Filterung war nur das Be-Fenster der Röntgen-Röhre vorhanden. Es wurden Bestrahlungen direkt in der O₂-Bestimmungszelle und in der oben erwähnten Anordnung zur Registrierung der NADH-Fluoreszenz durchgeführt.

Die Bestrahlung in der O₂-Bestimmungszelle hatte keinen Einfluß auf den polarographischen O₂-Nachweis. Für die Bestimmung der Lichtstreuung ergab sich eine geringe Änderung der Anzeige durch röntgenstrahlungsbedingte Fluoreszenz.

Bei der Bestimmung des relativen Reduktionsgrades der Pyridinnukleotide während der Bestrahlung ergab sich eine geringe Störung durch strahlenbedingte Fluoreszenz an der Magnetrührer-Beschichtung. Bei der seitlichen Bestrahlung der O₂-Bestimmungszelle konnten wir eine Dosisleistung von 1,1 krd/min erreichen. Die gleiche Dosisleistung wurde bei der Bestrahlung in der Anordnung zur kontinuierlichen Registrierung des NAD-Reduktionsgrades erreicht. Hierbei haben wir durch eine kreisförmige Öffnung in einer Messingabschir-

mung, zur Vermeidung einer direkten Bestrahlung der Wände der Küvette, bestrahlt.

Die Bestimmung der Dosis erfolgte in allen Fällen mittels der Eisensulfat-Dosimetrie nach Fricke (29). Zusammensetzung der Lösung: FeSO_4 1 mM, NaCl 1 mM und H_2SO_4 bis zu einer Gesamt- SO_4^{--} -Normalität von 0,185 N. Der G-Wert für die Bildung von Fe^{+++} ($G = 15,6$) und deren Extinktionskoeffizient bei Zimmertemperatur (22°C) ($\epsilon = 2,15 \cdot 10^3 \text{ l M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) wurden aus Radiation Dosimetry (Attix u. Roesch) (29) entnommen.

2.7. γ -Bestrahlung

Die Bestrahlung mit γ -Strahlen wurde an einer 20 kCi ^{60}Co -Quelle in dem sogenannten Ringschieber der Anlage durchgeführt. Die Dosisleistung betrug 11,5 krd/min.

2.8. Versuchsanordnung zur Bestrahlung von NADH-Lösungen

Zum Ansetzen der Lösungen für die strahlenchemischen Untersuchungen wurde aqua bidestillata bei den gepufferten Lösungen verwandt. Für die Versuche ohne Puffer wurde dieses Wasser noch viermal destilliert: einmal aus einem oxydierenden Gemisch (Glaskolben), einmal aus einem reduzierenden (ebenfalls Glaskolben) und dann über eine Quarz-Bidestille destilliert. Der pH-Wert dieses Wassers lag bei 6.

Die Begasung erfolgte bei den Versuchen in Puffer mit N_2

O_2 und N_2O (technisch) der Firma Messer-Griesheim ohne weitere Reinigung. Die Gase wurden durch eine Pasteurpipette

in die zu bestrahlende Lösung unter ständigem Rühren einge-
leitet. Dieselbe befand sich in einem 50 ml Becherglas,
welches mit einem doppelten Parafilm verschlossen wurde.
Die Probe wurde von 15 Min. vor der Bestrahlung bis Ende
der Bestrahlung begast. Mit der O_2 -Bestimmungs-Zelle konnte
geprüft werden, daß nach 3-4 minütigem Einleiten von N_2
der Sauerstoff praktisch vollständig verdrängt war. In
dieser Anordnung wurde eine Dosisleistung bei seitlicher
Bestrahlung von 1,3 krd/min erreicht.

Bei den Versuchen in reinem Wasser (ungepuffert) wurde in
einem Solidex-Glas-Meßkolben mit Silikonstopfen und zwei
Kapillaren zum Ein- und Austritt der Gase bestrahlt. Die
Gase (N_2 und N_2O) wurden durch eine gesättigte alkalische
Pyrogallol-Lösung zum Entfernen etwaiger O_2 -Spuren geschickt.
Bei der hier benutzten Anordnung erreichten wir eine Dosis-
leistung von 3 krd/min.

3. VORBEMERKUNG ZU DEN MITOCHONDRIEN

Die bekanntesten Funktionen dieser Organellen sind die Atmung und die oxydative Phosphorylierung, das heißt, die Phosphorylierung von ADP, die an die Elektronentransportkette gekoppelt ist. Eine schematische Darstellung der Elektronentransportkette mit den dazugehörigen drei Kopplungsstellen der oxydativen Phosphorylierung (nach Lehninger (50)) ist in Abb. 3 zu sehen.

Chance und Williams (16,41) haben die Bedingungen, die den O_2 -Verbrauch und Oxido-Reduktions-Zustand der einzelnen Glieder beeinflussen, systematisch zusammengefaßt und die einzelnen metabolischen Zustände benannt. Tab. 1 gibt dazu einen Überblick. Im elektronenmikroskopischen Bild (Abb. 4) (32) zeigt sich, daß die Mitochondrien aus zwei geschlossenen Membranen (innere und äußere Mitochondrienmembran) bestehen. Die Einbuchtungen der inneren Mitochondrienmembran nennt man Cristae mitochondrialis und den inneren Raum Matrix-Raum.

Die meisten Enzyme der oben abgebildeten Elektronentransportkette sind sehr eng an die innere Mitochondrienmembran gebunden (24).

Das elektronenmikroskopische Bild der Cristae ändert sich je nach der metabolischen Lage der Mitochondrien (32,31) (Abb. 4).

Über die Natur der energiereichen Zwischenprodukte, die bei der oxydativen Phosphorylierung von ADP entstehen

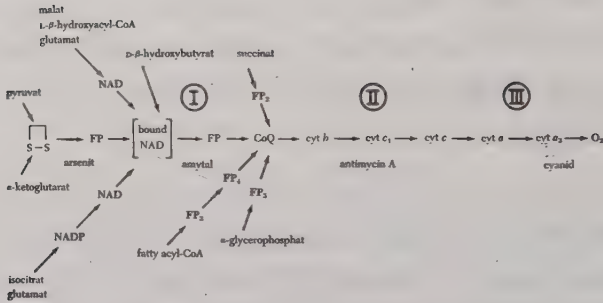
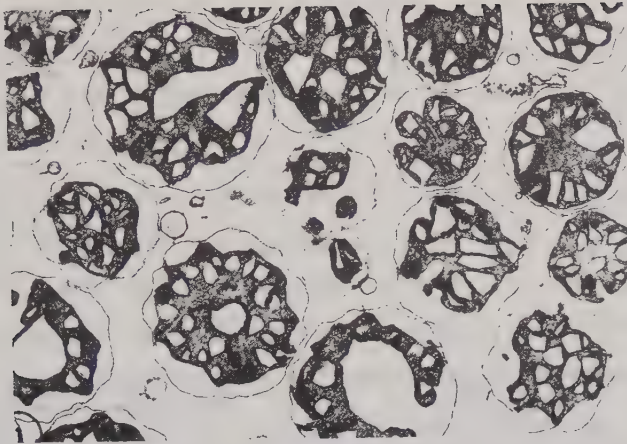
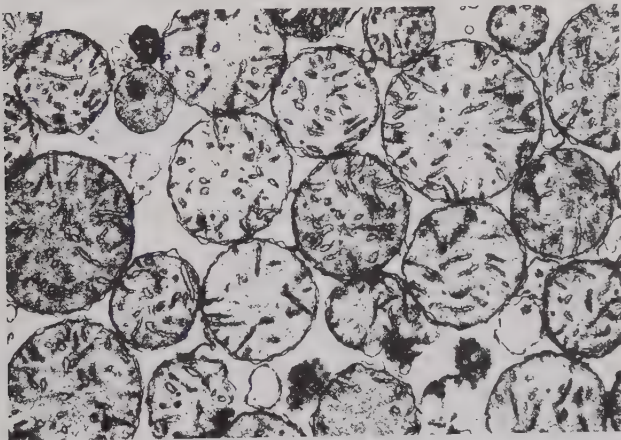


Abb. 3. Schematische Darstellung der Atmungskette an den Mitochondrien mit den drei Kopplungsstellen der oxydativen Phosphorylierung (römische Zahlen) nach Lehninger (50)



a)

1 μ m



b)

Abb. 4. Elektronenmikroskopische Bilder von Rattenleber-Mitochondrien

a) im energetischen Status 3

b) im energetischen Status 4

aus Hackenbrock et. al. (32)

Tab. 1.

The metabolic states of mitochondria according to Chance and Williams, 1956

State	Characteristics					Steady-state percentage reduction of components				
	[O ₂]	ADP level	Substrate level	Respiration rate	Rate-limiting substance	a	c	b	Flavo-protein *	DPNH
1	>0	low	low	slow	ADP	0	7	17	21	~90
2	>0	high	~0	slow	substrate	0	0	0	0	0
3	>0	high	high	fast	respiratory chain	<4	6	16	20	53
4	>0	low	high	slow	ADP	0	14	35	40	>99
5	0	high	high	0	oxygen	100	100	100	150	100

* These values are based upon the amount of flavoprotein that is reduced upon addition of antimycin A to the mitochondria in state 2, that is, two-thirds the state 5 value.

müssen, besteht noch keine Einigkeit. Es können chemische Zwischenprodukte sein (62,68), elektrochemische Potentiale (56,57) oder Strukturänderungen an der inneren Mitochondrienmembran (32,10,31,13).

Die von Hackenbrock (32) in Abhängigkeit von dem metabolischen Zustand der Mitochondrien beobachteten Veränderungen der inneren Mitochondrienmembran lassen sich auch als Änderung der Lichtstreuung einer Mitochondriensuspension erfassen (61,60).

Abb. 5 zeigt das mit unseren Präparationen beobachtete Verhalten des O_2 -Verbrauchs, der Lichtstreuung und der Fluoreszenz der reduzierten Pyridinnukleotide in Abhängigkeit von der Anwesenheit von ADP. Man kann sehen, daß der Reduktionsgrad der Pyridinnukleotide im metabolischen Status 3 (mit ADP) kleiner ist als im Status 4 (ohne ADP). Also steigt nach dem Verbrauch von ADP der Reduktionsgrad an.

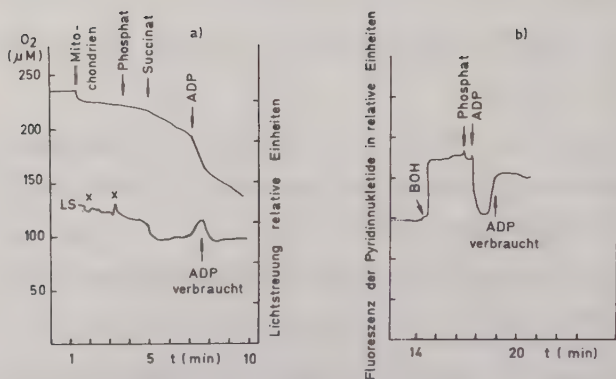


Abb. 5. Verhalten der Mitochondrien-Präparationen in verschiedenen metabolischen Stadien

a) O_2 -Verbrauch und 90° Lichtstreuung bei 546 nm

b) Redox-Zustandsänderungen der Pyridinnukleotide

a) Mitochondrien-Konzentration ist $0,5 \frac{mgProt.}{ml}$.

Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der angegebenen Zugaben: Succinat 3 mM, Phosphat 2 mM PH 7,4 und ADP $100 \mu M$.

b) Mitochondrien-Konzentration ist $1,5 \frac{mgProt.}{ml}$.

Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der angegebenen Zugaben: β -Hydroxybutyrat 3 mM, Phosphat 2 mM PH 7,4 und ADP $150 \mu M$.

Präparationsmedium: 1 mM EDTA, 0,25 M Saccharose und mit 10 mM Tris-HCl-Puffer auf PH 7,4 gebracht. Das EDTA diene zur besseren Erfassung der Änderung der Lichtstreuung mit dem metabolischen Zustand.

Reaktionsmedium: 0,1 M Saccharose, 3 mM $MgCl_2$ mit Tris auf PH 7,4 gebracht.

Bei der optischen Registrierung treten oft nicht vermeidbare Störungen durch die Reagentienzugabe auf (X)

4. ERGEBNISSE

4.1.1. Strahlenreaktionen während der Bestrahlung

Bei Bestrahlung (1,1 krd/min) der Mitochondrien in Anwesenheit von Substrat (3 mM Succinat) konnten wir ein leichtes "Schrumpfen" (erkennbar an der Erhöhung der Streuung bei 546 nm) der Mitochondrien feststellen.

Durch diese Vorversuche und durch die Ergebnisse von Versuchen anderer an Hefekulturen (71) ermutigt, haben wir die Atmungsrate der Mitochondrien in den metabolischen Stadien 3 und 4 sowie den Wert der respiratorischen Kontrolle, den ADP/O-Quotienten, die kleinen Schrumpfungs-Schwellungs-Zyklen und den relativen Reduktionsgrad der Pyridinnukleotide in dessen beiden metabolischen Stadien während der Bestrahlung untersucht. Bei der angewandten Dosisleistung von 1,1 krd/min konnten wir bei diesen Parametern eine strahlenbedingte Reaktion nicht beobachten.

Ebenso negativ verliefen die Versuche, bei denen wir den relativen Reduktionsgrad der Pyridinnukleotide in den Mitochondrien, in Anwesenheit von Substratüberschuß - β -Hydroxybutyrat (BOH) - während der Bestrahlung untersuchten.

4.1.2. Strahlenreaktionen nach der Bestrahlung

Aus den (zumindest bei der angewandten Dosisleistung) im wesentlichen negativen Ergebnissen während der Bestrahlung haben wir gefolgert, daß, wenn eine Strahlenschädigung auftritt, sich diese erst entwickeln mußte, damit sie die

Testreaktionen beeinflusst. Da wir nun aus Beobachtungen in unseren Versuchen vermuteten, daß - in Analogie zum Verhalten der Erythrozyten (58,69) - die Entwicklung des Schadens von der Anwesenheit von Substrat abhängig war, haben wir in folgenden Versuchen mit substratverarmten Mitochondrien gearbeitet.

Wenn man dem Inkubationsmedium der Mitochondrien Phosphat und ADP adäquater Konzentration zugibt, dann veratmen diese das endogene Substrat in 2 bis 5 Minuten. Dies kann man zum Beispiel am Reduktionsgrad des NADH erkennen (Abb. 1 in (43)). In Abb. 6 läßt sich der zeitliche Gang der Reaktion der Pyridinnukleotide nach Zugabe der Mitochondrienfraktion ansehen.

Bestrahlt man die Suspension direkt nach der Zugabe der Mitochondrien, so tritt ein deutlicher Strahleneffekt erst nach Zugabe von BOH zutage. In Abb. 6 ist zu erkennen, daß erstens der zeitliche Gang der Reduktion der Pyridinnukleotide eine Stufe zeigt, die in der Kontrolle nur angedeutet ist, und zweitens, die Reduktion gegenüber der Kontrolle nicht vollständig ist.

Wie in Abb. 5 demonstriert wird, nimmt der Reduktionsgrad der Pyridinnukleotide beim Übergang von Stadium 3 zu Stadium 4 zu.

Die "Stufe" deutet also auf Anwesenheit von ADP während dieser Zeit hin (Deutung wie Abb. 1 in (43)), was durch eine geringere Atmungsgeschwindigkeit, durch eine erhöhte ATPase-Aktivität oder durch Hemmung der oxydativen Phos-

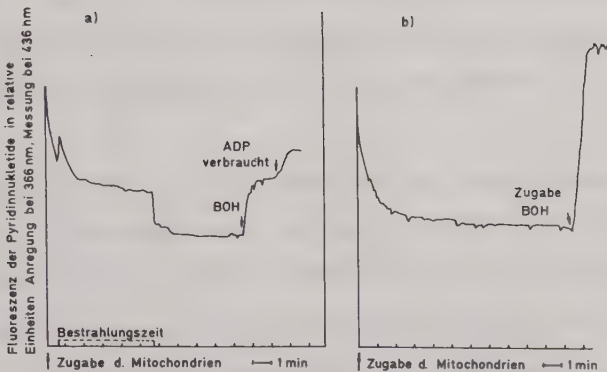


Abb. 6. zeigt die Reduktion der Pyridinnukleotide nach 12 Minuten Inkubation ohne Substrat, nach Zugabe von 3 mM β -Hydroxybutrat (BOH)

a) Inkubation ohne Bestrahlung

b) Bestrahlung mit 5,5 krd Gesamtdosis ($1,1 \frac{\text{krd}}{\text{min}}$).

Das Inkubationsmedium bestand aus: 0,1 M Saccharose, 11 mM Phosphat-Puffer pH 7,4, 6,8 mM MgCl_2 , $150 \mu\text{M}$ ADP.

Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der BOH-Zugabe und des Verbrauches von ADP.

Die Erhöhung der Fluoreszenzanzeige während der Bestrahlung wird durch röntgenstrahlenbedingte Fluoreszenz am Magnetprüher bewirkt.

phorylierung an sich erklärt werden kann. Die Frage kann aus diesen Experimenten nicht entschieden werden. Aber ein Vergleich mit "alternden" Mitochondrien, wo diese "Schulter" mit zunehmendem Alter ausgeprägt wird, läßt vermuten, daß diese eine Hemmung der oxydativen Phosphorylierung widerspiegelt.

Der zweite Effekt ist die Hemmung der maximal erreichbaren Reduktion der Pyridinnukleotide. Diese Hemmung ist als Funktion der applizierten Dosis in Abb. 7 dargestellt.

Als erste Erklärungsmöglichkeit bietet sich eine Entkopplung der Atmung und der oxydativen Phosphorylierung an, womit der Effekt durch erhöhte Atmungsgeschwindigkeit im Stadium 4 zu erklären wäre. Aufgrund des Auftretens einer "Stufe" in der Reduktion ist es aber unwahrscheinlich, daß die beobachtete Hemmung der maximalen Reduktion der Pyridinnukleotide in der Hauptsache durch eine Entkopplung verursacht wird. Diese Erklärungsmöglichkeit wird später durch die beobachtete Hemmung der Veratmung von NAD-abhängigem Substrat weiter entkräftet.

Als weitere Möglichkeiten ergeben sich: eine Hemmung der BOH-Dehydrogenase, NAD-NADP-Transhydrogenase und ein Aus-treten der Pyridinnukleotide oder eine strahlenbedingte Degradation derselben.

Bedeutsam ist in der Abb. 7, daß die Hemmung der Reduktion der Pyridinnukleotide schon bei 2,7 krd applizierter Dosis deutlich auftritt.

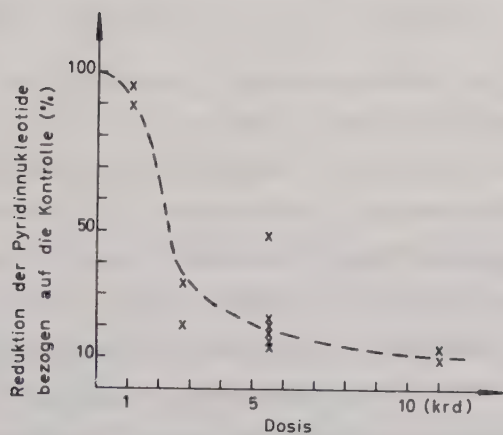


Abb. 7. Verhalten der Reduktion der Pyridinnukleotide nach Bestrahlung, experimentelle Bedingungen wie in Abb. 6

Die Bestimmung der BOH-abhängigen Atmung ergibt einen entsprechenden Dosis-Effekt-Verlauf. Auch hier tritt schon bei 2,7 krd eine deutliche Hemmung der Testreaktion auf (Abb. 8a). Die Veratmung von anderen NADH-abhängigen Substraten, Glutamat und α -Ketoglutarat, ist auch entsprechend gehemmt (Abb. 9). Dagegen ist der succinatabhängige O_2 -Verbrauch der Mitochondrien kaum beeinträchtigt (Abb. 8b). Man kann hieraus schließen, daß der auf die Atmungskette gesetzte Strahlenschaden vor dem Coenzym Q (Eintrittsstelle des Succinates in die Atmungskette) liegt (siehe Abb. 1 und 9). Eine Empfindlichkeitsdifferenz gegenüber Röntgenstrahlen von BOH- und Succinat-Veratmung ist schon von Clarke und Lang (17) beschrieben worden. Die Strahlendosen, bei denen der Strahleneffekt auftritt, sind hier aber ca. 10 mal kleiner.

Aus Abb. 9 läßt sich entnehmen, daß der Schaden 15 Minuten nach Beginn der Bestrahlung noch nicht voll entwickelt ist. Das heißt, daß der Schaden eine gewisse Zeit braucht (Minuten-Bereich), um sich zu manifestieren. Aus diesem Grunde hat es uns interessiert, den zeitlichen Ablauf dieses Vorganges zu untersuchen. Das konnten wir aber, wegen der geringen Dosisleistung, die uns an der Röntgenröhre zur Verfügung stand, mit diesem Gerät nicht studieren.

4.1.3. γ -Bestrahlung

Mit Hilfe der zehnmal höheren Dosisleistung, die uns mit einer 20 kCi ^{60}Co -Quelle zur Verfügung stand, konnten wir den zeitlichen Ablauf der Entwicklung des Strahlenschadens

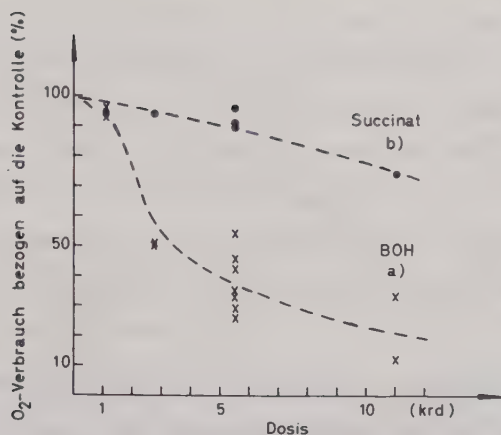


Abb. 8. Verhalten der β -Hydroxybutyrat(BOH)- und Succinat-Veratmung nach Bestrahlung.

Nach Bestimmung der Reduktion der Pyridinnukleotide wie in Abb. 6 wurden 3 ml Mitochondrien-Suspension in die O_2 -Bestimmungszelle gebracht und nach Zugabe von $200\text{ }\mu\text{M}$ ADP die Atmungsrate bestimmt. Die Messung beginnt mit der ADP-Zugabe (welche 12 bis 15 Minuten nach Beginn der Inkubation erfolgte). Danach wurden 3 mM Succinat und $200\text{ }\mu\text{M}$ ADP zugegeben und die Succinat-Veratmung verfolgt. Sonstige Bedingungen wie in Abb. 6

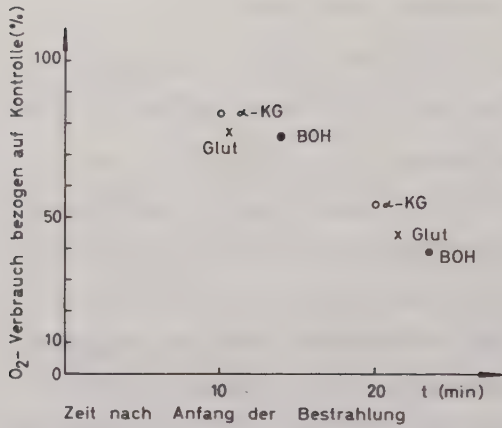


Abb. 9. Hemmung der β -Hydroxybutyrat-, Glutamat- und α -Ketoglutarat-Veratmung 10-15 und 20-25 Minuten nach Beginn der Bestrahlung durch 5,5 krd Röntgenstrahlen. Substratkonzentration im Testmedium 3 mM, sonstige Bedingungen wie in Abb. 8

nach der Bestrahlung untersuchen.

In Abb. 10 sind die Ergebnisse nach einer Bestrahlung von 11 krd auf substratverarmte Mitochondrien dargestellt. Es läßt sich erkennen, daß die strahlenbedingte Hemmung der BOH-Veratmung erst 25 - 30 Minuten nach der Bestrahlung voll zutage tritt. Die "Halbwertszeit" liegt etwa bei 12 Minuten. Wie oben erwähnt, ist der Strahlenschaden auf die Atmungskette im wesentlichen zwischen BOH-Dehydrogenase und Coenzym Q (Abb. 1) gesetzt worden.

Wenn die Hemmung der BOH-Veratmung durch eine Permeabilitätsänderung der mitochondrialen Membran für NAD und entsprechendes Austreten dieser Substanz aus den Mitochondrien verursacht wird, sollte man im Inkubationsmedium nach Bestrahlung NAD erwarten. Wir haben das Suspensionsmedium nach Abzentrifugieren der Mitochondrien zu verschiedenen Zeitpunkten auf NAD^+ untersucht.

Abb. 11 läßt den zeitlichen Ablauf des Auftretens von NAD^+ im Außenmedium nach Bestrahlung erkennen. Die Kurve b beschreibt das Verhalten der unbestrahlten Probe. Demnach tritt NAD^+ aus den Mitochondrien nach der Bestrahlung heraus.

Die Permeabilitätsänderung der mitochondrialen Innenmembran, gemessen an der Geschwindigkeit des Austretens von NAD^+ , ist erst mindestens 5 Minuten nach Anfang der Bestrahlung deutlich erkennbar. Das heißt, es müssen noch irgendwelche Prozesse nach der Bestrahlung ablaufen, bevor sich die Permeabilitätsänderung voll manifestiert. Daß sich diese Prozesse beeinflussen lassen, wird später dargetan.

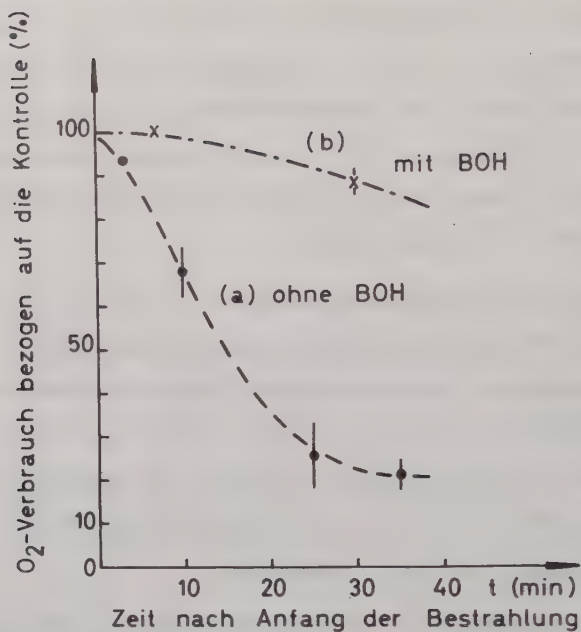


Abb. 10. Zeitlicher Gang der Hemmung der β -Hydroxybutyrat (BOH)-Veratmung nach 11,5 krd γ -Bestrahlung.
Experimentelle Bedingungen siehe nächste Seite.

Experimentelle Bedingungen zu Abb. 10:

Die Mitochondriensuspension wurde in das Bestrahlungsmedium gegeben (Endkonzentration um 1,5 mg/ml). Die 24 ml Suspension werden vermischt und in zwei 50 ml Bechergläser aufgeteilt. Die eine Hälfte dient als Kontrolle und die andere wird mit ^{60}Co γ -Strahlen bestrahlt. Von der Zugabe der Mitochondriensuspension bis Beginn der Bestrahlung verstreichen etwa 2 Minuten. $t = 0$ in der graphischen Darstellung ist mit dem Zeitpunkt zu Beginn der Bestrahlung identisch. Nach der Bestrahlung werden hintereinander und alternierend 3 ml der bestrahlten Probe und der Kontrolle in die Sauerstoffzelle gegeben. Nach 3 - 5 Minuten "Stabilisierung" wird β -Hydroxybutyrat (BOH) (3 mM) und danach ADP (150 μM) dazugegeben. In der graphischen Darstellung ist dieser letzte Zeitpunkt als Zeitpunkt der Messung angegeben. Mit einer Präparation werden zwei Bestrahlungen durchgeführt. Bei der zweiten Bestrahlung wird zur Kontrolle und zur bestrahlten Probe 1 bis 2 Minuten nach der Bestrahlung BOH (3 mM) in das Inkubationsgefäß zugegeben. Sonstige Bedingungen wie eben beschrieben

Kurve a): ohne BOH, Kurve b): mit BOH.

Inkubations- und Bestrahlungsmedium wie in Abb. 6

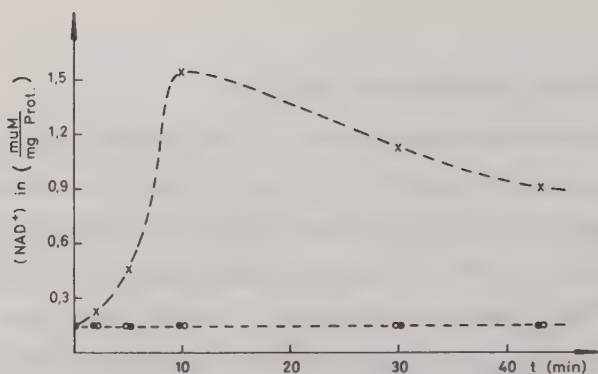


Abb. 11. Verlauf des strahlenbedingten Austretens von NAD^+ aus den Mitochondrien nach 11,5 krd γ -Bestrahlung. Zum angegebenen Zeitpunkt werden 2 ml aus dem Inkubationsgefäß (Kontrolle und bestrahlt) entnommen und abzentrifugiert; (der angegebene Zeitpunkt fällt mit dem Einschalten der Zentrifuge zusammen). Der klare Überstand wird umgefüllt und in Eis bei 0°C bis zur Analyse aufbewahrt.

a) (o) Bestrahlt, mit BOH inkubiert,

b) (x) bestrahlt, ohne BOH inkubiert,

(•) unbestrahlt, mit und ohne BOH inkubiert.

Für sonstige Bedingungen siehe Abb. 10.

Ob das Fehlen des NAD^+ in den Mitochondrien die hauptsächliche Ursache für die Hemmung der BOH-Veratmung ist, prüften wir mit folgendem Experiment: Man bestrahlt die Mitochondrien unter den erwähnten Bedingungen und wartet, bis sich der Schaden entwickelt hat. Dies läßt sich durch Zugabe von BOH kontrollieren. Gibt man jetzt NAD^+ in das Testmedium (10^{-4}M Endkonzentration), dann steigt die Atmung annähernd auf den Kontrollwert an. Aus dem bisher Geschilderten kann man schließen, daß erstens die Permeabilität der Mitochondrien (wahrscheinlich Innenmembran) (42) gegenüber NAD^+ geändert ist und zweitens, das daraus resultierende Aus-treten des NAD^+ als Hauptursache für die beobachtete Hemmung der Oxydation von BOH anzusehen ist.

Aus der am Anfang erwähnten Tatsache, daß wir bei Anwesenheit von BOH keine Strahlenwirkung auf den Reduktionszustand der Pyridinnukleotide nachweisen konnten, haben wir vermutet, daß das Auftreten eines Strahlenschadens von dem metabolischen Status der Mitochondrien abhängig ist. Mit den kurzen Zeiten (1 Minute), die bei der Gamma-Bestrahlung erforderlich sind, um ausreichende Dosen zu applizieren, konnten wir den Einfluß der BOH auf die Entwicklung des Strahlenschadens untersuchen.

Abb. 10 zeigt, daß die Hemmung der BOH-Veratmung fast völlig ausbleibt. Aus Abb. 11 kann man erkennen, daß NAD^+ im Außenmedium nach Bestrahlung nicht mehr auftritt.

Die Schutzwirkung des BOH auf die Mitochondrienpermeabilität gegenüber NAD^+ kann man als eine Hemmung der nach

Bestrahlung eintretenden Reaktionen, die zu der Permeabilitätsänderung führen, deuten.

Die Schutzwirkung von BOH auf seine eigene Veratmung läßt sich als Folge aus diesem Prozeß erklären, da wir gefunden hatten, daß das Austreten von NAD^+ als hauptsächliche Ursache der Hemmung der BOH-Veratmung anzusehen ist.

Ein Kriterium, welches als recht empfindlich gegenüber Schädigungen der Mitochondrien angesehen wird, ist die respiratorische Kontrolle (RC-Wert) (Respiratory Control Ratio) (16). Der RC-Wert ist definiert als der Quotient der Atmungsgeschwindigkeit von Mitochondrien im Status 3 zu derjenigen im Status 4, nach Verbrauch des ADP.

Es ist aus Abb. 12 zu erkennen, daß dieses Kriterium bei Inkubation der Mitochondrien ohne BOH einen stärkeren Effekt zeigt, als bei Inkubation in Anwesenheit von BOH, wobei ein Strahleneffekt nicht sicher nachzuweisen ist. Der niedrige Wert der Kontrolle im letzteren Fall ist zum Teil darauf zurückzuführen, daß dieser Test etwa eine Stunde später mit derselben Präparation durchgeführt wurde, als der vorherige. Trotzdem liegen beide RC-Werte der bestrahlten Probe, die ohne BOH inkubiert waren, tiefer als diejenigen, die mit BOH inkubiert wurden.

Also auch bei diesem schwerer zu deutenden, aber als empfindlich anerkannten Test zeigt sich eine Hemmung der Entwicklung der Strahlenwirkung durch Anwesenheit von Substrat in der Mitochondriensuspension nach Bestrahlung.

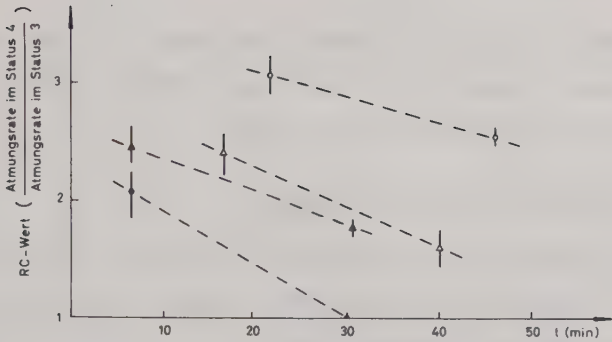


Abb. 12. Schutzwirkung von BOH auf die "respiratorische Kontrolle" (RC-Wert). Experimentelle Bedingungen wie Abb. 10. Der RC-Wert ist als Quotient der Atmungsrate in Anwesenheit von ADP dividiert durch die Atmungsrate nach Verbrauch von ADP.

- Kontrolle ohne Substrat
- △ Kontrolle mit Substrat
- ▲ bestrahlt mit Substrat
- bestrahlt ohne Substrat

4.2. Strahleneffekte auf das Redox-System NAD^+ - NADH in wässriger Lösung

Da das NADH bei den untersuchten Reaktionen eine wesentliche Rolle spielt, haben wir uns für dessen Verhalten bei Bestrahlung in wässriger Lösung interessiert.

4.2.1. Bestrahlung in Pufferlösung

Begonnen haben wir die Experimente mit einer 8×10^{-5} molaren NADH -Lösung in 0,1 molarem Phosphatpuffer von pH 7,4, einem sehr häufig benutztem Puffer.

Um den Effekt des Sauerstoffs bei der Strahlenwirkung auf dieses System abzuschätzen, haben wir Bestrahlungen in O_2 - und in N_2 -Atmosphäre durchgeführt. Weiterhin haben wir in N_2O -Atmosphäre bestrahlt, um Aussagen über die relative Wichtigkeit der hydratisierten Elektronen (e_{aq}^-) gegenüber den Radikalen ($\text{OH}^\bullet$) zu bekommen.

Die Abb. 13a und 13b zeigen die Abnahme der NADH -Konzentration durch Röntgenbestrahlung, gemessen direkt über die Extinktion bei 340 nm (Abb. 13a) und an der Fluoreszenz nach enzymatischer Reduktion zu NAD^+ (Abb. 13b).

Es ist zu erkennen, daß die Abnahme des NADH (sowohl die coenzymatische Aktivität als auch die Extinktion bei 340 nm) nach Bestrahlung unter N_2O -Begasung etwa doppelt so groß ist wie unter Stickstoff. Man kann also sagen, daß die Abnahme im wesentlichen durch die $\text{OH}^\bullet$ -Radikale bedingt wird. Vergleicht man die Bildung von NAD^+ unter Bestrahlung in N_2 -

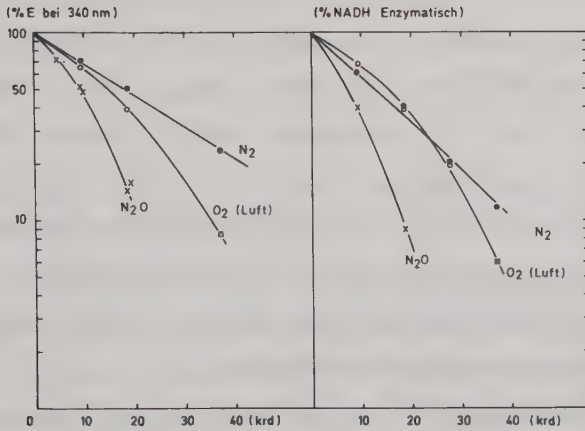


Abb. 13. Abnahme von NADH in Lösung durch Röntgenbestrahlung
bei Sättigung mit verschiedenen Gasen

bzw. N_2O -Atmosphäre, so sieht man, daß diese bei N_2O -Sättigung zweimal größer als bei N_2 ist. Es ist also anzunehmen, daß auch für die strahlenbedingte Reaktion $NADH + h\nu \rightarrow NAD^+$ im wesentlichen die OH-Radikale verantwortlich sind. Dies konnte auch dadurch bekräftigt werden, daß in Anwesenheit von Äthanol (10^{-3} molar) unter N_2O -Atmosphäre nach 20 krd kein NAD^+ nachgewiesen werden konnte. Als primäre Reaktionspartner der Radiolyseprodukte des Wassers bieten sich neben dem NADH bei unseren Versuchsbedingungen die Phosphat-Ionen an.

Grabner und Gettoff (30) haben für die hier interessierenden anorganischen Phosphat-Ionen folgende Reaktionskonstanten bestimmt (siehe Tab. 2).

Tab. 2: Reaktionskonstante ($k \cdot 10^5 \text{ l Mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) für die Reaktionen der e_{aq}^- und $OH^\cdot$ mit Orthophosphat-Ionen:

	e_{aq}^-	OH
$H_2PO_4^-$	66 ± 8	65 ± 14 32 ± 11
HPO_4^{2-}	$2,8 \pm 1,3$	$7,9 \pm 0,4$ $8,4 \pm 2,1$ $7,0 \pm 1,8$

Für die in unserem Falle vorkommenden Konzentrationen ergeben sich folgende Reaktionsgeschwindigkeiten:

$$\text{Gesamtreaktionsgeschwindigkeit des } e_{aq}^- = 1,7 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$$

$$\text{Gesamtreaktionsgeschwindigkeit des } OH^\cdot = 1,8 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}.$$

Für die Reaktion des NADH mit dem hydratisierten Elektron

(e_{aq}^-) haben Land und Swallow (46) eine Reaktionskonstante von $2,5 \times 10^{10} \text{ (L}^1\text{Mol}^{-1}\text{s}^{-1})$ ermittelt. Wie später zu sehen ist, haben wir eine obere Grenze für die Reaktionskonstante für NADH mit $\text{OH}^\bullet$ zwischen $7,2 \cdot 10^8 \text{ (L}^1\text{Mol}^{-1}\text{s}^{-1})$ und $3,5 \cdot 10^9 \text{ (L}^1\text{Mol}^{-1}\text{s}^{-1})$ bestimmt.

Aus den sich hieraus ergebenden Reaktionsgeschwindigkeiten von $2 \times 10^6 \text{ (s}^{-1})$ und zwischen $5,7 \times 10^4 \text{ (s}^{-1})$ und $2,8 \times 10^5 \text{ (s}^{-1})$ für das NADH mit e_{aq}^- bzw. $\text{OH}^\bullet$ kann man, durch Vergleich mit den entsprechenden Geschwindigkeiten für Phosphat-Anionen, sehen, daß letztere zumindest bezüglich $\text{OH}^\bullet$ mit dem NADH kompetieren können. Da in diesem System die $\text{OH}^\bullet$ offenbar für den überwiegenden Teil des Effektes verantwortlich sind, kann nicht ausgeschlossen werden, daß der Strahleneffekt über Radikale zustande kommt, die durch die Reaktion von Phosphat-Ionen mit $\text{OH}^\bullet$ entstehen. Der Einfluß von O_2 auf den Bestrahlungseffekt ist in den Abb. 13a, 13b, 14a und 14b graphisch dargestellt. Für kleine Bestrahlungsdosen ist eine Schutzwirkung zu beobachten (Abb. 13b), die bei größeren Dosen in eine Sensibilisierung übergeht. Der nichtexponentielle Kurvenverlauf der Dosiseffektkurve steht in Einklang mit Experimenten, die von Schachinger (64) mitgeteilt wurden. Daß der Schutzeffekt in Abb. 13a nicht zu sehen ist, bedeutet, daß unter N_2 -Atmosphäre mehr Produkte entstehen, die verschieden von NADH sind und bei 340 nm absorbieren. Eine mögliche Erklärung liegt darin, daß das $\text{NAD}^\bullet$ -Radikal durch Wasserstoffentzug vom NADH entsteht, welches sehr rasch mit O_2 zu NAD^+ rekombinieren

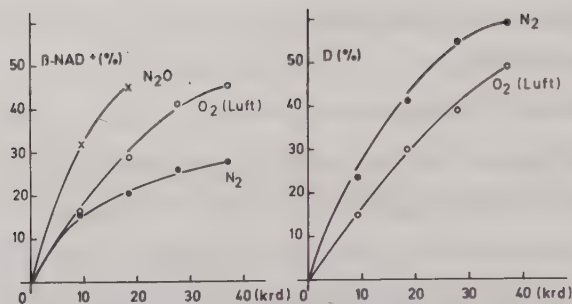
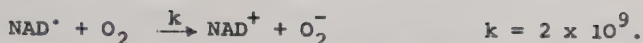


Abb. 14. a) Bildung von NAD^+ durch Röntgenbestrahlung einer NADH-Lösung unter Begasung mit den angegebenen Gasen.
 b) Bildung von Deaktivierungsprodukten, bestimmt aus der Mengenbilanz vor und nach Bestrahlung.

$$[\text{NADH}]_{\text{vor Bestr.}} = [\text{NADH}]_{\text{nach Bestr.}} + [\text{NAD}^+] + [\text{D}]$$

in % der Ausgangs-NADH-Konzentration bei Sättigung mit Luft und N_2

kann (46).



In Abwesenheit von O_2 würde ein größerer Teil davon miteinander reagieren und das Dimer bilden



welches bei 340 nm stark absorbiert.

Die G-Werte für die Bildung von NAD^+ unter N_2^- , O_2^- und N_2O -Atmosphäre sind 1, 1 bzw. 2,3.

Etwa zu gleicher Zeit, in welcher diese Versuche durchgeführt wurden, publizierten Land und Swallow (47) die entsprechenden G-Werte für Versuche, die in Pyrophosphatpuffer (0,01 M, pH 8,6) in Argon, N_2O - und O_2 -Atmosphäre durchgeführt wurden. Die G-Werte stimmen mit den unsrigen trotz unterschiedlichen Puffers - bis auf die Neubildung von NAD^+ in Argon, verglichen mit unseren in N_2 - gut überein.

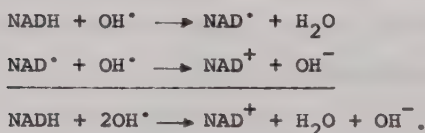
4.2.2. Bestrahlung von NADH in reinem Wasser

Mit der Absicht, zu klären, ob das Phosphat einen meßbaren Einfluß auf den Strahleneffekt auf NADH in Lösung hat, haben wir Versuche in reinem Wasser durchgeführt. Bei einer Bestrahlungsdosis von 9 krd haben wir den G-Wert für das Verschwinden von NADH unter N_2 zu 2,6 und in N_2O -Atmosphäre zu ca. 2,7 bestimmt. Bemerkenswert ist, daß im Gegensatz zu entsprechenden G-Werten in Phosphat (3,4 in N_2 und 6,1 in N_2O) erstens beide kleiner sind, und daß zweitens die Umwandlung der e_{aq}^- in $\text{OH}^\bullet$ durch N_2O keinen Einfluß auf die Ausbeute hat. Letzteres bedeutet, daß entweder e_{aq}^- und $\text{OH}^\bullet$

einzelnen in gleichem Maße eine Inaktivierung von NADH bewirken, oder aber daß die Wahrscheinlichkeiten der im einzelnen möglichen Reaktionen so verschoben werden, daß die Gesamt-Inaktivierungsrate nicht beeinflußt wird. Letztere Möglichkeit ist wahrscheinlicher, weil die Ausbeute an NAD^+ unter N_2 -Atmosphäre einen G-Wert von ca. 0,5 zeigte und unter N_2O -Atmosphäre der G (NAD^+) Wert ca. 1 ist.

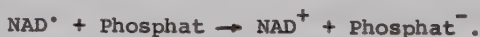
Man muß also annehmen, daß die beobachteten Reaktionen im System mit Phosphat hauptsächlich von Produkten, die aus der Reaktion der Wasserradikale mit den Phosphationen entstehen, bewirkt werden.

Für die Bildung von NAD^+ aus NADH erscheinen folgende Reaktionen wahrscheinlich:



Die Wirkung der Phosphationen drückt sich auch in einer Vergrößerung des G-Wertes für die Bildung von NAD^+ aus NADH unter N_2O -Atmosphäre (G-Wert in PPuffer 2,3) aus.

Eine zusätzliche Möglichkeit des Einflusses der Phosphationen bietet sich noch in der Reaktion dieser mit den NAD-Radikalen gemäß:



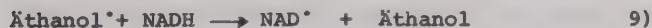
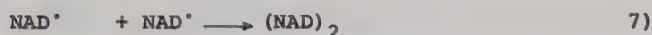
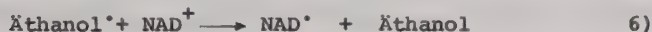
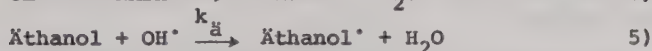
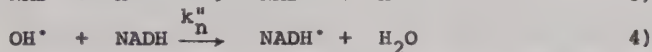
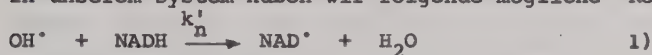
Diese Reaktion würde die eine Erhöhung der Wahrscheinlichkeit der Bildung von NAD^+ mit sich bringen, was der Beobachtung entspricht. Eine Reaktion von weiteren NAD-Radikalen mit

Phosphationen ist auch denkbar.

Zur Abschätzung einer Reaktionskonstante von $\text{OH}^\bullet$ mit NADH kann die Bildung von NAD^+ benutzt werden.

Bestrahlt man NADH in Anwesenheit von N_2O und Äthanol, dann verringert sich die NAD^+ -Ausbeute gegenüber in Abwesenheit von Äthanol. Diese Versuche können als Konkurrenz zwischen Äthanol und NADH um das $\text{OH}^\bullet$ gedeutet werden.

In unserem System haben wir folgende mögliche Reaktionen:



Wobei k_i die jeweiligen Reaktionskonstanten sind.

Reaktion 1) ist sehr wahrscheinlich als Zwischenstufe zur Bildung von NAD^+ . Diese wurde schon von Land und Swallow (47) und Schellenberg (65) postuliert. Reaktion 2) oder 3) sind dann als Endstufe zur Bildung von NAD^+ notwendig. Das $\text{OH}^\bullet$ kann mit NADH auch an einer weiteren Stelle (Reaktion 4) als das katalytisch wirksame H-Atom (Reaktion 1) angreifen. Reaktion 5) ist schon länger bekannt (3). Reaktion 6) wurde 1955 von Swallow postuliert (70). Reaktion 7) ist von Land und Swallow (46) nachgewiesen worden. Reaktion 8) soll das

Abfangen von $\text{OH}^\bullet$ durch eventuelle Verunreinigungen in der NADH-Präparation symbolisieren. In Analogie zur Reaktion Äthanol $^\bullet$ + RSH $\rightarrow$ Äthanol + RS $^\bullet$ (1) ist die Reaktion 9) mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit vorhanden.

Zur Abschätzung einer maximalen Reaktionskonstante für die Reaktion des NADH-Moleküls mit den $\text{OH}^\bullet$ -Radikalen können

a) außer 1, 4 und 5 alle anderen $\text{OH}^\bullet$ -konsumierenden Reaktionen vernachlässigt werden. b) Mit Hilfe der Reaktion 6) unter der Annahme, daß die Verringerung der NAD^+ -Ausbeute nach Äthanol-Zugabe ausschließlich durch diese Reaktion bewirkt wird, kann eine untere Grenze für die Äthanolradikal-Ausbeute und somit eine obere Grenze für $k_n' + k_n'' = k_n$ abgeschätzt werden.

$$\Delta G(\text{NAD}^+) = G(\text{NAD}^+)_{\text{ohne Äth.}} - G(\text{NAD}^+)_{\text{mit Äth.}} = G(\text{Äth}^\bullet).$$

Unter Voraussetzung a) ist somit die Wahrscheinlichkeit, daß das $\text{OH}^\bullet$ -Radikal mit Äthanol reagiert:

$$W(\text{OH}^\bullet + \text{Äth}) = \frac{k_a(\text{Äth})}{k_n(\text{NADH}) + k_a(\text{Äth})}$$

und der G-Wert für Äth $^\bullet$

$$G(\text{Äth}^\bullet) = G(\text{OH}^\bullet) \frac{k_a(\text{Äth})}{k_n(\text{NADH}) + k_a(\text{Äth})} ;$$

durch Kerhwertbildung erhält man dann

$$\frac{1}{G(\text{Äth})} = \frac{1}{G(\text{OH}^\bullet)} \times \left\{ \frac{k_n(\text{NADH})}{k_a(\text{Äth})} + 1 \right\}$$

und unter Berücksichtigung von Voraussetzung b) erhält man

$$\Delta G(\text{NAD}^+) = \frac{1}{G(\text{OH}^\bullet)} \times \left\{ \frac{k_n(\text{NADH})}{k_a(\text{Äth})} + 1 \right\} \quad (\text{I})$$

In der graphischen Darstellung von $\frac{1}{\Delta G(\text{NAD}^+)}$ gegen das Verhältnis $\frac{(\text{NADH})}{(\text{Äth})}$ erhält man eine gute Gerade (Abb. 15).

Der hieraus erhaltene Maximalwert für k_n^* wäre

$$k_n = k_a \cdot S \cdot G(\text{OH}^*) = k_a \cdot 0,6 \cdot 5,35 = k_a \cdot 3,2,$$

wobei S die Steigerung der Gerade ist.

Die Extrapolation der Geraden für $\frac{(\text{NADH})}{(\text{Äth})} \rightarrow 0$ ergibt als Grenzwert einen G-Wert von 1,1 für $\Delta G(\text{NAD}^+)$. Wenn aber alle Äth*-Radikale mit (NAD^+) reagieren, sollte man einen G-Wert von 5,35 erwarten. Hieraus erscheint es wahrscheinlich, daß nur jedes fünfte Äthanolradikal mit NAD^+ reagiert, die anderen könnten z.B. nach Reaktion 9) reagieren. Demnach wäre $G(\text{Äth}) \approx 5 \times \Delta G(\text{NAD}^+)$, und damit wird Gleichung (I) zu

$$\frac{1}{\Delta G(\text{NAD}^+)} = \frac{5}{G(\text{OH})} \left\{ \frac{k_n(\text{NADH})}{k_a(\text{Äth})} + 1 \right\}$$

und

$$k_n = k_a \cdot 5 \cdot S \cdot G(\text{OH}) = 0,65 k_a.$$

Nach diesen Überlegungen liegt also die obere Grenze für die Reaktionsgeschwindigkeit k_n zwischen $7,2 \times 10^8$ und $3,5 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$. Hierbei wurde $k_a = 1,1 \times 10^9$ gesetzt (1).

4.2.3. Bestrahlung von NADH in Anwesenheit von Cystein

Mit der Absicht über Kompetitionsversuche mit Radikalfängern mehr über dieses System zu erfahren, haben wir Versuche in Anwesenheit von Cystein durchgeführt. Dabei hat sich ergeben, daß in dem System mit Phosphat, in Anwesenheit von O_2 , Cystein (10^{-2}) entsprechend den Versuchen von Schachinger schützend wirkt.

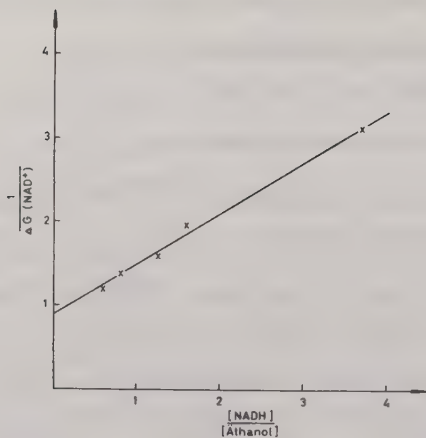


Abb. 15. Abhängigkeit NAD^+ -Ausbeute von der Anwesenheit von Äthanol unter N_2 -Atmosphäre.

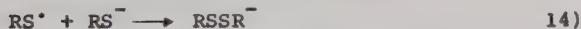
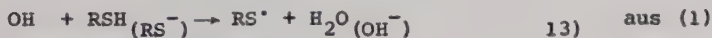
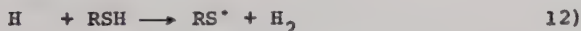
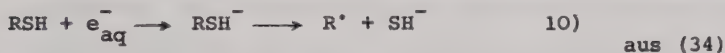
$$\frac{1}{\Delta G(\text{NAD}^+)} = \frac{1}{G(\text{NAD}^+)_{\text{ohne Äthanol}} - G(\text{NAD}^+)_{\text{mit Äthanol}}}$$

Bei Bestrahlung in Abwesenheit von O_2 tritt dagegen eine starke Sensibilisierung ein. Der G-Wert steigt von $G = 3,4$ durch Zugabe von 10^{-2} M Cystein auf 6,9.

In dem System ohne Puffer ist die Situation entsprechend. Der G-Wert nimmt (unter N_2) von 2,6 ohne Cystein auf $G = 4,7$ mit 10^{-2} M Cystein zu. Bei dieser Cystein-Konzentration muß man annehmen, daß alle Radikale praktisch vollständig von Cystein abgefangen werden.

Die Degradation von NADH wird also von den Cysteinradikalen übernommen.

Man kann für das Cystein folgende Reaktionen annehmen:



Da diese Reaktionen einschließlich 14) wegen der hohen RSH-Konzentration mit großer Wahrscheinlichkeit stattfinden, dürfte das $RSSR^-$ praktisch das einzige Radikal sein, welches mit NADH reagiert.

Da NAD^+ mit $G \approx 1$ entsteht, kann



Wahrscheinlich finden aber auch Dehydrierungen an weiteren Stellen des NADH-Moleküls noch statt, weil die NAD^+ -Ausbeute

so klein ist. Wenn Reaktion 15) stattfindet, würde es bedeuten, daß NADH eine Schutzwirkung auf das RSH ausübt.

Das Wesentliche, was hier gezeigt werden konnte, ist die Reaktion eines RSSR^- -Radikals mit einem biologisch wichtigen Molekül, das dadurch zum Teil inaktiviert wird. Dieses deutet darauf hin, daß dieses Radikal bei Überlegungen über die dosismodifizierende Strahlenwirkung von SH-haltigen Substanzen auf biologisches Material mit einbezogen werden muß.

5. DISKUSSION

5.1. Allgemeines

Die Rolle der Membran bei der Strahlenschädigung von Zellen ist noch umstritten. Wie anfangs erwähnt, deuten einige Untersuchungen darauf hin, daß membranöse Systeme entscheidend an den biologischen Strahlenreaktionen beteiligt sein können.

So ist zum Beispiel bei Erythrocyten ein K^+ -Austritt nach Bestrahlung zu beobachten. Da dieser durch Anwesenheit von Glucose im Inkubationsmedium hemmbar ist, muß angenommen werden, daß der Schaden der Erythrocytenmembran entweder vom Redox- oder vom energetischen Zustand der Zelle abhängig ist. Die Entwicklung des Strahlenschadens wird also von dem physiologischen Zustand der Zellen nach Bestrahlung beeinflusst.

In Analogie hierzu war es vorstellbar, daß der Unterschied der Strahlenempfindlichkeit mitochondrialer Funktionen zwischen in vivo- und in vitro-Bestrahlungen, zum Teil durch den unterschiedlichen metabolischen Zustand der Mitochondrien, mitbedingt sein könnte.

Die Tatsache, daß wir schon bei 2,7 krd eine deutliche Beeinträchtigung der BOH-Veratmung durch die Mitochondrien fanden, im Gegensatz zur viel stärkeren Resistenz, die von Clarke und Lang (17) für diesen Prozeß beobachtet wurde (deutlicher Effekt erst bei 50 bis 100 krd), zeigt, daß auch bei Mitochondrien die experimentellen Bedingungen

die Strahlenreaktion wesentlich beeinflussen. Dies bedeutet, daß bei der Übertragung von Ergebnissen strahlenbiologischer Untersuchungen an Mitochondrien in vitro auf deren Verhalten in der Zelle der metabolische Status und das unmittelbare Milieu der Mitochondrien nicht vernachlässigt werden können. Da diese sich aber in der Zelle wiederum ändern können, kann eine Änderung der "Strahlenantwort" der Mitochondrien bei Änderung des physiologischen Zustandes nicht ausgeschlossen werden.

Wie wir gesehen haben (Abb. 10), manifestiert sich die Hemmung der BOH-Veratmung erst nach einigen Minuten. Betrachten wir nun den zeitlichen Ablauf des Erscheinens von NAD^+ im Suspensionsmedium (Abb. 11), so sehen wir, daß am Anfang seine Geschwindigkeit nicht monoton abnimmt, wie zu erwarten wäre, wenn direkt nach der Bestrahlung der Schaden an der Mitochondrienmembran - im Sinne einer Permeabilitätsänderung - schon fixiert wäre. Da die erwähnte Geschwindigkeit in den ersten Minuten erst ansteigt, muß angenommen werden, daß sich die Permeabilität gegenüber NAD während dieser Zeit noch ändert.

Aus Versuchen, bei denen die Mitochondrien direkt nach der Bestrahlung mit BOH gehalten wurden, läßt sich erkennen, daß die Entwicklung des Strahlenschadens, gemessen an dem NAD^+ -Austritt, der BOH-Veratmung und dem RC-Wert gehemmt wird (Abb. 12). Die beiden ersteren Vorgänge können dadurch erklärt werden, daß das NAD in reduzierter Form vorliegt und somit fester an die Membran gebunden ist (40). Die NAD-

Moleküle können dann nicht austreten, und die BOH-Veratmung bliebe unbeeinträchtigt. Da aber durch die BOH-Anwesenheit während der Inkubation die respiratorische Kontrolle auch geschützt ist, muß das Substrat (BOH) auch die Prozesse hemmen, die hier zur Beeinträchtigung der respiratorischen Kontrolle führen.

Ob, in Analogie zur Phosphat-bedingten Schwellung der Mitochondrien in Anwesenheit von Mg^{++} -Ionen unter Zugabe von L-Histidin (19), irgendwelche energetischen Intermediate von Bedeutung sind, läßt sich zur Zeit noch nicht entscheiden.

Es ist wahrscheinlich, daß die Entwicklung der Permeabilitätsänderung in den ersten Minuten durch chemische Reaktionen langlebiger oxydierender Radikale bewirkt wird. Die Wahrscheinlichkeit, daß diese Oxydationen von essentiellen Bestandteilen der Mitochondrien verhindert oder rückgängig gemacht werden, wäre durch den höheren Reduktionsgrad derselben, der durch die BOH-Anwesenheit bewirkt wird, erhöht. Wir meinen, daß dies die nächstliegende Erklärung für die Schutzwirkung von BOH ist.

Das Wesentliche, was wir zeigen konnten, scheint uns die Abhängigkeit der "Strahlenantwort" vom metabolischen Zustand der Mitochondrien zu sein. Gestärkt wird diese Ansicht durch die sensibilisierende Wirkung von Cystein auf reines NADH in Lösung unter Cystein-Überschuß. Dieser Effekt von Cystein ist wahrscheinlich auf leichtere Oxydierbarkeit von NADH gegenüber Cystein durch die Cysteinradikale zurückzuführen.

Gleichzeitig zeigt dies aber die Schwierigkeit auf, die sich mit Anwendung strahlenchemischer Ergebnisse auf die Bedingungen *in vivo* ergibt.

In dieser Beziehung ist auch die Änderung des strahlenchemischen Verhaltens von NADH bei Zugabe von Orthophosphat von Interesse. Hierbei verläuft die Degradation in Anwesenheit von N_2O mit einem G-Wert von ca. 4,7 ohne Phosphat-Ionen. Mit Phosphat hat man einen G-Wert von ca. 6,1. Von J. Holian und W.M. Garrison (36) ist bei geringer Cystein-Konzentration ($2,5 \times 10^{-3}\text{M}$) eine sensibilisierende Wirkung auf die strahlenchemische Degradation von Cytosin (0,5 M) in Abwesenheit von O_2 beschrieben worden. Der G-Wert stieg von $\approx 0,9$ auf 2,8 ohne bzw. mit Cystein.

Diese Tatsachen stärken die Hypothese, die von Bacq und Alexander (7,8) aufgestellt wurde, wonach die Schutzwirkung von SH-haltigen Substanzen primär in dem durch diese verursachten "enzymatischen Schock" in der Zelle oder dem Organ zu suchen ist.

Die Idee, daß der metabolische Zustand der Zelle wichtig für deren Strahlenantwort ist, läßt sich auch auf den Effekt von O_2 auf die Strahlenwirkung anwenden.

5.2. Überlegungen zum O₂-Effekt

Hierbei läßt sich die relative Zunahme der Strahlenempfindlichkeit mit Zunahme der O₂-Konzentration durch folgende Beziehungen beschreiben:

$$Sr = \frac{S(O_2)}{S(N_2)} = \frac{K + [O_2]_m}{K + [O_2]} \quad \text{(Alper und Howard-Flanders)} \quad (5,6)$$

Es bestehen im wesentlichen zwei Vorstellungen über den Reaktionsmechanismus, die zu dieser Beziehung führen.

Neary (59) vertritt die Ansicht, daß ein latenter Schaden drei Reaktionsmöglichkeiten hat: a) daß er rückgängig gemacht wird, b) daß er ohne Reaktion mit Sauerstoff fixiert wird und c) daß er nach Reaktion mit Sauerstoff fixiert wird.

k_1 , k_2 und k_3 seien die jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeiten (Abb. 16),

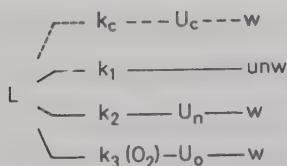


Abb. 16. Schema der Reaktionsmöglichkeiten eines latenten Schadens (nach Neary). Der gestrichelte Reaktionsweg symbolisiert die Reaktion mit zugesetztem Cystein.

Wenn U_n die Wahrscheinlichkeit für eine Reparatur eines Schadens ist, der nicht mit O_2 reagiert hat, und U_o die entsprechende Wahrscheinlichkeit für einen Schaden, der mit O_2 reagiert hat, dann ergibt sich für die Sensibilität

$$S(O_2) \triangleq \frac{k_2 U_n + k_3 [O_2]}{k_1 + k_2 + k_3 [O_2]} \frac{U_o}{[O_2]} \quad \text{für } [O_2] \rightarrow 0 \Rightarrow S(N_2) \triangleq \frac{k_2 U_n}{k_1 + k_2} ;$$

$$\text{für } [O_2] \rightarrow \infty \Rightarrow S(O_2) \triangleq U_o$$

und somit für relative Sensibilisierung durch O_2

$$Sr = \frac{S(O_2)}{S(N_2)} = \frac{\frac{k_1 + k_2}{k_3} + [O_2] \frac{U_o}{U_n} \frac{k_1 + k_2}{k_2}}{\frac{k_1 + k_2}{k_3} + [O_2]} \quad (59)$$

Wir betrachten jetzt die Schutzwirkung von Cystein auf E.coli B (4) unter N_2 - und unter O_2 -Atmosphäre mit der Annahme, daß dieses mit den primären Strahlenschäden direkt reagiert und sie damit mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit U_c restauriert. Die Geschwindigkeitskonstante für diese Reaktion sei $k_c = k$ (Cysteinkonzentration), wobei k die Reaktionskonstante symbolisiert (Abb. 16).

Für $S(O_2)$ und $S(N_2)$ ergibt sich dann:

$$S^c(O_2) \triangleq \frac{k_2 U_n + k_3 [O_2] U_o + k_c U_c}{k_1 + k_2 + k_3 [O_2] + k_c}$$

und

$$S^c(N_2) \triangleq \frac{k_2 U_n + k_c U_c}{k_1 + k_2 + k_c} .$$

Die Schutzwirkung auf E.coli B ohne Sauerstoff ist gleich 1,2 und mit O_2 2,4, d.h. $S(O_2) = 2,4 \times S^C(O_2)$ und $S(N_2) = 1,2 \times S^C(N_2)$ (4). Aber Zähler und Nenner des Bruches $S(N_2)$ sind kleiner als diejenigen des Bruches $S(O_2)$, so ist also die Beeinflußbarkeit (Schutzwirkung) in Abwesenheit von O_2 größer, als wenn es anwesend ist. Da aber

$$\frac{S(O_2)}{S^C(O_2)} > \frac{S(N_2)}{S^C(N_2)},$$

läßt sich dieser experimentelle Befund mit dieser Modellvorstellung nicht vereinbaren. Das heißt, entweder stimmt die angenommene Wirkungsweise von Cystein nicht, oder (und) der Wirkungsmechanismus von O_2 ist ein anderer.

T. Alper (4) vertritt die Ansicht, daß es zwei unabhängig voneinander entstehende, grundsätzlich verschiedene Schadens-Typen gibt. Der L_o -Schadentyp sei der weitgehend für den O_2 -Effekt verantwortliche Schaden und L_n der "im wesentlichen" von der O_2 -Anwesenheit unabhängige Schadentyp (Abb. 17).



Abb. 17. Schematische Darstellung der Reaktionsmöglichkeiten der latenten Schäden (nach Alper (4)). Die gestrichelten Reaktionswege symbolisieren die Reaktionen, die durch Zugabe von Cystein eingeleitet werden.

Für die Sensibilitäten unter Stickstoff und unter Sauerstoff ergibt sich dann

$$S(O_2) \hat{=} l_o \frac{k_1 U_o^n + k_2 [O_2] U_o^o}{k_1 + k_2 [O_2]} + l_n \frac{k_3 U_n^n + k_4 [O_2] U_n^o}{k_3 + k_4 [O_2]}$$

$$\text{für } [O_2] \rightarrow 0: S(O_2) \hat{=} l_o U_o^o + l_n U_n^o$$

$$S(N_2) \hat{=} l_o U_o^n + l_n U_n^n$$

und für die relative Sensibilisierung durch O_2

$$S_r = \frac{\frac{k_1 k_3}{k_2 k_4} + [O_2] \frac{k_2 k_3 (\alpha U_o^n + U_n^n) + k_1 k_4 (\alpha U_o^n + U_n^o)}{k_2 k_4 (\alpha U_o^n + U_n^n)}}{\frac{k_1 k_3}{k_2 k_4} + [O_2] \frac{k_1 k_4 + k_2 k_3}{k_2 k_4}} + [O_2]^2 \frac{\alpha U_o^o + U_n^o}{\alpha U_o^n + U_n^n}$$

wobei l_o = Anzahl der L_o -Typ Schäden, l_n = Anzahl der L_n -Typ Schäden, $\alpha = \frac{l_o}{l_n}$, k_i die Reaktionskonstanten und U_i^1 die entsprechenden Wahrscheinlichkeiten für eine Fixierung des Schadens. Diese Formel stimmt nicht mit der ursprünglichen "Alper-Formel" überein, kann aber unter bestimmten Voraussetzungen näherungsweise den gleichen Kurvenverlauf zeigen.

Betrachten wir nun die Wirkung von Cystein mit diesem Modell unter der Voraussetzung, daß Cystein mit L_o und L_n Schäden mit der Geschwindigkeit von k_c und k'_c reagiert, dann ergibt sich für die Sensibilitäten

$$S(O_2) \hat{=} l_o \frac{k_1 U_o^n + k_2 [O_2] U_o^o + k_c U_c}{k_1 + k_2 [O_2] + k_c} + l_n \frac{k_3 U_n^n + k_4 U_n^o [O_2] + k_c' U_c'}{k_3 + k_4 [O_2] + k_c'}$$

$$S(N_2) \hat{=} l_o \frac{k_1 U_o^n + k_c U_c}{k_1 + k_c} + l_n \frac{k_3 U_n^n + k_c' U_c'}{k_3 + k_c'}$$

$$\text{für } [O_2] \rightarrow \infty \Rightarrow S(O_2) \hat{=} l_o U_o^o + l_n U_n^o .$$

Aus $S(O_2) [O_2] \rightarrow \infty$ geht hervor, daß die Empfindlichkeit bei genügend großer O_2 -Konzentration nicht beeinflusbar ist. Dies bedeutet wiederum für die Erklärung der Cysteinwirkung mit diesem Modell, daß das bestimmende Glied bei $S(O_2)$ bei der angewandten O_2 -Konzentration und bei Cystein-Anwesenheit durch weitere Zugabe von O_2 noch verkleinert werden kann.

Um unter O_2 eine Schutzwirkung von 2,4 zu erreichen, muß, wenn das Glied mit l_o bei $S(O_2)$ bestimmend ist,

$$k_c \geq 1,4 (k_2 [O_2] + k_1)$$

Da aber bei luftgesättigtem Wasser $k_2 [O_2] \approx 50 k_1$ ist, wird $k_c \geq 50 k_1$, was wegen der großen Konzentrationen an anderen Molekülen, die in der Zelle herrschen, sehr unwahrscheinlich erscheint. Eine sichere Aussage hierüber kann jedoch durch Erhöhen der O_2 -Konzentration getestet werden.

Wie uns scheint, läßt sich auch mit diesem Modell die Wirkungsweise von Cystein nicht durch direkte Reaktion desselben mit den latenten Schäden erklären. Dieses steht im Einklang mit der Annahme von Bacq und Alexander eines biochemischen Schocks, durch den SH-haltige Schutzsubstanzen ihre

Wirkung entfalten sollen. Wenn man nun eine direkte Reaktion des Cysteins mit den latenten Schäden nicht annehmen darf, erscheint es uns nicht abwegig, für die Wirkung von O_2 auch eine indirekte Wirkung ins Auge zu fassen.

Hierfür nehmen wir an, daß O_2 über die Oxydation von O_2 -bindenden Molekülen seine Wirkung entfaltet, daß also der Redox-Zustand dieser Moleküle bestimmend ist. O_2 oxydiert die reduzierten Moleküle R zu RO

$R + O_2 \rightleftharpoons RO$ die Gesamtheit (G) der interessierenden Moleküle ist dann

$$[RO] + [R] = [G] \quad (II).$$

Nach dem Massenwirkungsgesetz gilt

$$\frac{[R][O_2]}{[RO]} = k_m$$

hieraus folgt unter Berücksichtigung von (II)

$$\frac{[R]}{[G]} = \frac{k_m}{k_m + [O_2]} \quad (III)$$

Wenn es zwei Arten latenter Schäden gibt, von denen einer (L_o -Typ) durch O_2 beeinflusbar ist und der andere (L_n -Typ) durch O_2 nicht beeinflusbar ist, können wir das Modell folgendermaßen formulieren: L_o -Typ latente Schäden können zwei verschiedene Reaktionswege einschlagen: den ersten mit einer Reaktionskonstanten $k_1 \left(\frac{k_m}{[O_2] + k_m} \right)$ durch Reaktion mit den reduzierten Molekülen und den zweiten mit einer Reaktionskonstanten k_2 durch Reaktion mit anderen von O_2 unabhängigen Molekülen. U_o^o und U_o^n seien die Wahrscheinlichkeiten dafür, daß die entsprechenden Reaktionswege zu einem wirksamen

Schaden führen.

L_n -Typ latente Schäden können mit einer Reaktionsgeschwindigkeit k_3 einen Weg einschlagen, der mit der Wahrscheinlichkeit U_n^n zu einem wirksamen Schaden führt (Abb. 18).

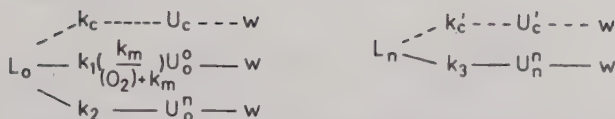


Abb. 18. Schematische Darstellung der hier entwickelten Vorstellung über die Reaktionsmöglichkeiten latenter Schäden. Die gestrichelten Reaktionswege symbolisieren den Einfluß von zugesetztem Cystein.

Für die Sensibilitäten in Anwesenheit und in Abwesenheit von O_2 ergibt sich somit mit l_o = Anzahl der L_o -Schäden und l_n = Anzahl der L_n -Schäden.

$$S(O_2) \hat{=} l_o \frac{k_1 \left(\frac{k_m}{[O_2] + k_m} \right) U_o^o + k_2 U_o^n}{k_1 \left(\frac{k_m}{[O_2] + k_m} \right) + k_2} + l_n U_n^n$$

$$\text{für } S(O_2) [O_2] \rightarrow \infty \hat{=} l_o U_o^n + l_n U_n^n$$

$$S(N_2) \hat{=} 1_0 \frac{k_1 U_0^O + k_2 U_0^n}{k_1 + k_2} + 1_n U_n^n = 1_0 \frac{k_1 U_0^O + k_2 U_0^n + \beta U_n^n k_1 + k_2}{k_1 + k_2}$$

Für $Sr = \frac{S(O_2)}{S(N_2)}$ erhält man mit $\beta = \frac{1_n}{1_0}$

$$Sr = \frac{\frac{k_1 + k_2}{k_2} k_m + [O_2] \frac{(k_1 + k_2) (U_0^n + \beta U_n^n)}{k_2 (U_0^n + \beta U_n^n) + k_1 (U_0^O + \beta U_n^n)}}{\frac{k_1 + k_2}{k_2} k_m + [O_2]}$$

Wir erhalten eine Gleichung der Form der "Alper Formel", welche eine lineare Beziehung zwischen der maximalen Sensibilisierung durch Sauerstoff (m) und der Resistenz unter N_2 -Atmosphäre $D_0(N_2)$ (wie beide vorstehend beschriebenen Vorstellungen) zu beschreiben vermag.

$$m = \frac{(k_1 + k_2) (U_0^n + \beta U_n^n)}{k_2 (U_0^n + \beta U_n^n) + k_1 (U_0^O + \beta U_n^n)}$$

$$\frac{1}{S(N_2)} \hat{=} \frac{k_1 + k_2}{k_1 (U_0^O + \beta U_n^n) + k_2 (U_0^n + \beta U_n^n)} \hat{=} D_0(N_2)$$

$$m \hat{=} (U_0^n + \beta U_n^n) D_0(N_2).$$

Wir berücksichtigen jetzt die Wirkung von Cystein entsprechend den vorherigen Beispielen. (Vgl. Abb. 18).

Für die Sensibilität erhalten wir

$$S(O_2) \hat{=} l_o \frac{k_2 U_o^n + k_1 U_o^o \left(\frac{k_m}{[O_2] + k_m} \right) + k_c U_c}{k_2 + k_1 \left(\frac{k_m}{[O_2] + k_m} \right) + k_c} + l_n \frac{k_3 U_n^n + k'_c U'_c}{k_3 + k'_c}$$

$$S(N_2) \hat{=} l_o \frac{k_2 U_o^n + k_1 U_o^o + k_c U_c}{k_2 + k_1 + k_c} + l_n \frac{k_3 U_n^n + k'_c U'_c}{k_3 + k'_c}$$

für $[O_2] \rightarrow \infty$

$$S(O_2) \hat{=} l_o \frac{k_2 U_o^n + k_c U_c}{k_2 + k_c} + l_n \frac{k_3 U_n^n + k'_c U'_c}{k_3 + k'_c}$$

Wie zu sehen ist, ist $S(O_2) ([O_2] \rightarrow \infty)$, im O_2 -abhängigen Glied, durch Hinzunahme der die Cystein-Wirkung repräsentierenden Terme, stärker beeinflusbar als $S(N_2)$ im entsprechenden Term. Somit ist die Annahme, daß Cystein seine Schutzwirkung vorwiegend durch direkte Reaktion mit subletalen Schäden (z.B. als H-Donator) entfaltet, mit diesem Modell vereinbar.

In Anbetracht der naheliegenden indirekten Wirkungsweise von O_2 erscheint uns aber wahrscheinlicher, daß Cystein seinen Schutzeffekt an einer späteren Stelle entfaltet, indem es die Wahrscheinlichkeiten U_1 dafür, daß ein Schaden wirksam wird, beeinflusst (in Anlehnung an die erwähnte Hypothese von Bacq und Alexander).

Eine Entwicklung des Modells unter der Annahme eines einzigen Schadenstypes - im Modell also $l_n = 0$ - führt zu Aussagen, die analog zu den eben formulierten sind. Das

Fehlen von Sauerstoff-Sensibilisierung bei Experimenten mit "Transformierendem Prinzip" (48) ist aber ein starkes Argument für die Existenz von zwei verschiedenen Schadenstypen. Wenn Membrane, wie Alper meint, die Stellen des L_O -Schadens-types sind, könnte angenommen werden, daß die durch O_2 direkt oder indirekt reduzierbaren Moleküle an der Membran gebunden oder sehr nahe an ihr sind, so daß sie die Entwicklung des Schadens beeinflussen können. Als allgemeiner Beitrag zu diesem Modell können unsere Versuche an Mitochondrien gewertet werden, wo offenbar der Reduktionszustand - hervorgerufen durch Zugabe von Substrat - die Entwicklung des Schadens wesentlich beeinflußt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde der Einfluß des metabolischen Zustandes der Mitochondrien auf deren Strahlenantwort untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, daß die Reduktion der Pyridinnukleotide durch Zugabe von BOH bei substratverarmten Mitochondrien und die Veratmung selbst durch Bestrahlung mit 2,7 krd schon deutlich beeinträchtigt waren. Die Entwicklung des Schadens ist abhängig von den Inkubationsbedingungen nach der Bestrahlung, dabei wirkt die Anwesenheit von BOH schützend. Der allgemeine Redox-Zustand scheint hier für die Strahlenreaktion der Mitochondrien von Bedeutung zu sein. Das Ausreten von NAD aus den Mitochondrien hat sich als hauptsächliche Ursache für die Hemmung von der BOH-Veratmung erwiesen.

Bei Versuchen über die strahlenchemischen Reaktionen von NADH in reinem Wasser und mit Orthophosphat gepufferter Lösung hat sich gezeigt, daß die Phosphationen oder/und die Radikale an den strahlenbedingten Reaktionen maßgeblich beteiligt sind. Die Anwesenheit von Cystein in N_2 -Atmosphäre verstärkt die Strahlenwirkung auf NADH sowohl in gepufferter als auch in reiner wässriger Lösung.

Unsere Ergebnisse lassen sich in die Hypothese von Bacq und Alexander, wonach der physiologische Zustand der Zellen wesentlich für deren Strahlenreaktion ist, gut einfügen.

Die Annahme, daß der Reduktionsgrad gewisser Moleküle für die Strahlenreaktion von Zellen von Bedeutung sein kann, wird auf den "Sauerstoff-Effekt" angewandt. Es zeigt sich,

daß das Modell, welches sich hieraus ergibt, sich mit den aus der Literatur entnommenen experimentellen Ergebnissen gut vereinbaren läßt und daß es bei der Einwirkung von Cystein auf den "Sauerstoff-Effekt" Vorteile gegenüber der Vorstellung, daß das O_2 mit den latenten Schäden direkt reagiert, bietet.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Adams, G.E. The General Application of Pulse
Radiolysis to Current Problems in
Radiobiology.
In Current Topics in Radiation
Research, Vol. III (Ed. Ebert, M.,
Howard, A.), North-Hol. Comp., 1967
- (2) Alexander, P. The Repair of DNA and the Mode of
Dean, C.J. Action of Sensitizers and Protectors
Lehman, A.R. in Biological Systems of Different
Ormerod, M.G. Complexity. In Radiation Protection
Feldschreiber, P. and Sensitization. p. 15 (Ed. Moro-
Serianni, R.W. sori, H.L. Quintiliani, M.)
Taylor & Francis Ltd. 1970
- (3) Allen, A.O. Radiation Chemistry of Water and
Aqueous Solutions.
D. Van Nostrand Company, Inc. Prin-
ceton, New Jersey, Toronto, New
York, London 1961
- (4) Alper, T. Mechanisms of Lethal Radiation Damage
to Cells.
In Microdosimetry. p.5 (Ed. Ebert,
H.G.) Commission of the European
Communities. Brussels 1970
- (5) Alper, T. The Modification of Damage Caused by
Primary Ionization of Biological
Targets. Rad. Res. 5, 573 (1956)

- (6) Alper, T. and
Howard-Flanders, P.

Role of Oxygen in Modifying the Radio-
sensitivity of E.coli B.
Nature 178, 978 (1956)
- (7) Bacq, Z.M. and
Alexander, P.

Importance for Radio-Protection of
the Reaction of Cells to Sulphydryl
and Disulphide Compounds.
Nature 203, 162 (1964)
- (8) Bacq, Z.M. and
Alexander, P.

Fundamentals in Radiobiology 2nd.
Edition. Pergamon Press 1966
- (9) Beisenherz, G
Boltze, H.J.
Bücher, T.H.
Czok, R.
Garbade, K.H.
Meyer-Arendt, E. u.
Pfleiderer, G.

Diphosphofructose-Aldolase, Phos-
phoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milch-
säure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-
Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase
aus Kaninchenmuskulatur in einem
Arbeitsgang.
Z. Naturforschg. 86, 555 (1953)
- (10) Boyer, P.

Carboxyl Activation as a Possible
Common Reaction in Substrate Level
and Oxydative Phosphorylation and in
Muscle Contraction.
In Oxidases and Related Redox Systems.
Vol. II p. 994 (Ed. King, T.E., Mason,
H.S. and Morrison, M)
Wiley New York 1965
- (11) Braun, H,

Chemical Protection and Cell Structu-
re. In Biological Aspects of Radia-
tion Protection. p. 173 (Ed. Suga-

- hara, T. and Hug, O.) Igaku Shoin Ltd. Tokoi, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1971
- (12) Bresciani, F.A. Mechanism of X-ray Inhibition of the Auricchio, F. and Sodium Pump in Human Erythrocytes: Fiore, C. Adenosintriphosphatase Activity of Stromata. Nature 196, 186 (1962)
- (13) Chance, B, The Nature of the Respiratory Chain: Azzi, A. Location of Energy Conservation Sites, Lee, I.Y. the High Energy Store, Electron Transfer-Linked Conformation and the Lee, C.P. and "Closedness" of Submitochondrial Mela, L. Vesicles. In Mitochondria Structure and Function. p. 233 (Ed. Ernster, L. and Drahota, Z.). Academic Press, London, New York 1969
- (14) Chance, B. and Respiratory Enzymes in Oxidative Baltscheffsky, H. Phosphorylation. J. Biol. Chem. 233, 736 (1958)
- (15) Chance, B, and Energy-Linked Reduction of Mitochondrial Pyridine Nucleotide. Hollunger, G. Nature 185, 666 (1960)
- (16) Chance, B. and The Respiratory Chain and Oxydative Williams, G.R. Phosphorylation. Advan. Enzymol. 17, 65 (1956)

- (17) Clarke, I.D. and The Inactivation of Mitochondrial
Lang, J. Enzymes by Gamma Radiation in vitro.
Rad. Res. 24, 142 (1965)
- (18) Cramp, W.A. Modification of Post-Irradiation DNA
Degradation in Escherichia coli B/r.
In Radiation Protection and Sensiti-
zation p. 155 (Ed. Moroson, H.L.,
Quintiliani, M.), Taylor and Francis
Ltd. London 1970
- (19) Conelly, J.L. and Participation of L-Histidine in the
Myron, D.R. Maintenance of Mitochondrial
Integrity.
Biochemistry 10, 102 (1971)
- (20) Dalrympe, G.V. Dinitrophenol decreases the Radiation
Sanders, J.L. and Sensitivity of L Cells.
Baker, M.L. Nature 216, 708 (1967)
- (21) Dalrympe, G.V. The Effect of 2,4-Dinitrophenol on
Sanders, J.L. the Repair of Radiation Injury by
Baker, M.L. and Cells.
Wilkinson, K.P. Rad. Res. 37, 90 (1969)
- (22) Elkind, M.M. and Radiation Response of Mamalian Cells
Sutton, H. Grown in Culture. L. Repair of X-Ray
Damage in Survival of Chinese
Hamster Cells.
Rad. Res. 13, 556 (1960)

- (23) Elkind, M.M. Damage and Repair Processes Relative
to Neutron and Charged Particles
Irradiation.
In Current Topics in Radiation Research
p. Vol. 7 (Ed. Ebert M. and Howard
A.). North-Holland Publishing
Company 1970
- (24) Ernster, L. Structure, Composition and Function
Kuylenstierna, B. of Mitochondrial Membranes.
In Mitochondria Structure and Function
p. 5 (Ed. Ernster, L., Droghada, Z.)
Academic Press, London, New York 1969
- (25) Estabrook, R.W. A Fluorometric Method for the Quan-
and Maitra, P.K. titative Microanalysis of Adenine and
Pyridine Nucleotides.
Anal. Biochem. 3, 369 (1962)
- (26) Estabrook, R.W. Fluorometric Determination of Mito-
Williamson, J.R. chondrial Adenine and Pyridine
Frenkel, R. and Nucleotides.
Maitra, P.K. In Methods in Enzymology. p. 474
(Ed. Estabrook, R.W. and Pullman,
M.E.). Academic Press, New York
and London 1967
- (27) Firket, H. et Effect de la Cystamine sur la
Lelièvre, P. Respiration, la Phosphorylation
Oxydative et l'Ultrastructure des
Mitochondries du Rat.

- and Photosynthesis. p. 285 (Ed.
Quagliarello, E., Papa, S., Rossi,
C.S.)
Adriatica Editrice Bari 1971
- (33) Hall, E.J. The Effect of Hypoxia on the Repair
of Sublethal Radiation Damage in
Cultured Mamalian Cells.
Rad. Res. 49, 405 (1972)
- (34) Hart, E.J. and The Hydrated Electron.
Anbar Wiley-Interscience A Division of
John Wiley & Sons. New York, London,
Sydney, Toronto 1970
- (35) Hasl, G. The Effect of X-Rays on the Potassium
Pauly, H. and Transport in Ehrlich-Ascites
Rajewsky, B. Tumor Cells.
IIIrd Int. Congr. Rad. Res.
Abstr. 413, (1966)
- (36) Holian, J. and Reconstitution Mechanisms in the
Garrison, W.M. Radiolysis of Aqueous Biochemical
Systems: Inhibitive Effects of
Thiols. Nature 221, 57 (1969)
- (37) Howard, A. The Oxygen Requirement in Split-
Dose Experiments with Oedogonium.
Int.J.Rad.Biol. 14, 341 (1968)
- (38) Howard, A. and Radiation Responses of Fern Spores
High, M.V. During their First Cell-Cycle.

- Int.J.Rad.Biol. 18, 147 (1970)
- (39) Johnson, D. and Lardy, H. Isolation of Liver or Kidney Mitochondria. In Methods of Enzymology. Vol. X p. 94 (Ed. Estabrook, R.W. and Pullman, M.E.). Academic Press, New York, London 1967
- (40) Kaufman, B. and Kaplan, N.O. Mechanism of Depletion of Mitochondrial Pyridine Nucleotides. Biochim.Biophys. Acta 39, 332 (1960)
- (41) Kiefer, J. The Importance of Cellular Energy Metabolism for the Sparing Effect of Dose Fractionation with Electrons and Ultra-Violet Light. Int.J.Rad.Biol. 20, 325 (1971)
- (42) Klingenberg, M. and Pfaff, E. Structural and Functional Compartmentation in Mitochondria. In Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria. p. 180 (Ed. Tager, J.M., Papa, S., Quagliariello, E. and Slater, E.C.)
- (43) Klingenberg, M. u. Slenczka, W. Pyridinnucleotide in Leber-Mitochondrien. Biochem.Z. 331, 486 (1959)
- (44) Krebs, H.A. Mitochondrial Generation of Reducing Power.

- In Biochemistry of Mitochondria.
p. 105 (Ed. Slater, E.C., Kaniuga, Z.
Wojtczak, L.). Academic Press,
London and New York 1967
- (45) Krebs, H.A. and Veech, R.L. Regulation of the Redox State of the Pyridine Nucleotides in Rat Liver.
In Pyridine Nucleotide Dependent Dehydrogenases. p. 413 (Ed. Sund, H.), Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1970
- (46) Land, E.J. and Swallow, A.J. One Electron Reactions in Biochemical Systems as Studies by Pulse Radiolysis. I Nicotinamide-Adenine Dinucleotide and Related Compounds. Biochim.Biophys.Acta 162, 327 (1968)
- (47) Land, E.J. and Swallow, A.J. One-Electron Reactions in Biochemical Systems as Studied by Pulse Radiolysis. IV Oxidation of Dihydronicotinamide-Adenine Dicleotide. Biochim.Biophys. Acta 234, 34 (1971)
- (48) Latarjet, R. Effects of Radiation and Peroxides on Viral and Bacterial Functions Linked to DNA Specificity.
In Ionizing Radiations and Cell Metabolism. p. 275 (Ed. Wolstenholme, G.E., O'Connor, E.M.)

- J. & A. Churchill Ltd.
London 1956
- (49) Lehman, F. and Wels, P. Effect of Röntgen Rays on the Permeability of Red Blood Cells for Electrolytes.
Arch.Ges.Physiol. 213, 628 (1926)
- (50) Lehninger, A.L. The Mitochondrion. p. 60
Verlag W.A. Benjamin Inc.
New York, Amsterdam 1965
- (51) Lehninger, A.L. Energy-Linked Ion Movements in
Carafoli, E. and Mitochondrial Systems.
Rossi, C.S. Adv. Enzymology 29, 259 (1967)
- (52) Littbrand, B. Oxygen-dependent Radiosensitivity
Variation in Mamalian Cells.
Thesis.Karolinska Institute,
Stockholm 1971
- (53) Littbrand, B. and Révesz, L. The Effect of Oxygen on Cellular
Survival and Recovery after
Irradiation.
Brit.J.Radiol. 42, 914 (1969)
- (54) Littbrand, B. and Revesz, L. Effect on a Second Exposure to X-Ray
on Post Irradiation Recovery.
Nature 214, 841 (1967)
- (55) Matsudaira, H. Metabolism of Ehrlich Ascites Tumor
Furuno, I. and Cells under "Anoxia" and its Impli-
Otsuka, H. cation in the Rejoining of X-Ray

- Induced DNA Strand Breaks.
In Biological Aspects of Radiation
Protection. p. 185 (Ed. Sugahara,
T. and Hug, O.).
Igaku Shoin Ltd. Tokio, Springer
Verlag, Berlin, Heidelberg, New
York 1971
- (56) Mitchel, P. Chemiosmotic Coupling in Oxidative
and Photosynthetic Phosphorylation.
Nature 191, 144 (1961)
- (57) Mitchel, P. Structure and Function of the
Respiratory Chain of Mitochondria
and Bacteria.
In Energy Transduction in Respiration
and Photosynthesis. p. 123
(Ed. Quagliariello, E., Papa, S.,
Rossi, C.S.)
Adriatica Editrice Bari 1971
- (58) Myers, D.K. and Biochemical Effects of X-Irradiation
Bide, R.W. on Erythrocytes.
Rad.Res. 27, 250 (1966)
- (59) Neary, G.J. The Interpretation of Survival
Curves in Relation to Radiation
Quality and Cellular Repair Mechanisms.
In Microdosimetry. p. 51 (Ed. Ebert,
H.G.), Commission of the European

Communities. Brussels 1970

- (60) Packer, L. Metabolic and Structural States of Mitochondria. II Regulation by Phosphate.
J.Biol.Chem. 236, 214 (1961)
- (61) Packer, L. Metabolic and Structural States of Mitochondria. I Regulation by Adenosine Diphosphate.
J.Biol.Chem. 235, 242 (1960)
- (62) Racker, E. Mechanisms in Bioenergetics.
Academic Press, New York, London 1965
- (63) Sanner, T. and Pihl, A. Significance and Mechanism of the Indirect Effect in Bacterial Cells. The Relative Protective Effect of Added Compounds in Escherichia Coli B, Irradiated in Liquid and Frozen Suspension.
Rad.Res. 37, 216 (1969)
- (64) Schachinger, L. Radiation Effects on NADH
Perez-Ayala, A. Biophysik 6, 6 (1969)
and Hug, O.
- (65) Schellenberg, K.A. Oxidation of Reduced Diphosphopyri-
and Hellermann, L. dine Nucleotide.
J.Biol.Chem. 231, 547 (1958)

- (66) Schneider, W.C. Intracellular Distribution of Enzymes. IIIth Oxidation of Octanoic Acid by Rat Liver Fractions. J.Biol.Chem. 176, 259 (1948)
- (67) Shenoy, M.A. Iodine Incorporated in Cell Constituent During Sensitization to Singh, B.B. and Radiation by Iodacetic Acid. Gopal-Arengar, A.G. Science 160, 199 (1968)
- (68) Slater, E.C. Energy-Conservations Mechanisms of Mitochondria. In Mitochondria Structure and Function. p. 205 (Ed. Ernster, L., Drohata, Z.) Academic Press, London, New York 1969
- (69) Sutherland, R.M. Repair of Radiation Damage to and Pihl, A. Erythrocyte Membranes: The Reduction of Radiation-Induced Disulfide Groups. Rad.Res. 34, 300 (1968)
- (70) Swallow, A.J. The Reduction of Diphosphopyridine Nucleotide by Ethanol under the Influence of X-Irradiation. Biochem.J. 61, 197 (1955)
- (71) Trampisch, W. Untersuchungen des Atmungs- und Gärungsstoffwechsels von Bakterien und Hefen unter Röntgenbestrahlung.

Diplomarbeit. Institut für Biophysik
der Justus Liebig-Universität
Gießen, 1968

(72) Wills, E.D.

The Effect of Irradiation in Sub-
Cellular Components. Metal Ion
Transport in Mitochondria.
Int.J.Rad.Biol. 11, 517 (1966)

Herrn Prof.Dr. A. Schraub, dem Direktor des Institutes für Biophysik der Justus Liebig-Universität Gießen, danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit.

Ebenfalls Herrn Prof. Schraub und Herrn Dr. E.L. Sattler möchte ich für die freundliche Unterstützung durch Rat- schläge und ermutigende Diskussionen bei der Durchführung der Arbeit danken.

Außerdem bin ich vielen Institutsmitgliedern für anregende Diskussionen und technische Hilfe sehr dankbar.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst bin ich für das mir gewährte Stipendium während meiner Studienzeit zu Dank verpflichtet.

LEBENS LAUF

Am 27. Januar 1943 wurde ich als Sohn des Buchhalters Francisco O j e d a B a c h m a n n und seiner Ehefrau Celinda geb. S c h w e n c k e in Osorno/Chile geboren. Ich besitze die chilenische Staatsangehörigkeit.

Von März 1948 bis Dezember 1960 absolvierte ich Volksschule und Gymnasium in der Deutschen Schule zu Osorno. Im Januar 1961 bestand ich das Abitur. Von März 1961 bis Juli 1962 studierte ich an der Fak. Wiss. der Universidad de Chile in Santiago.

Im Wintersemester 1962/63 habe ich mit dem Studium der Physik an der Justus Liebig-Universität Gießen angefangen und legte am 31. Juli 1964 die Diplom-Vorprüfung ab. In den folgenden vier Semestern habe ich im Institut für Biophysik unter der Leitung von Prof.Dr. A. Schraub meine Diplom-Arbeit über das Thema "Experimentelle und theoretische Untersuchungen zur Durchlässigkeit der Haut für das Edelgas Radon-222" angefertigt und bestand am 23. November 1967 die Diplom-Hauptprüfung.

Vom 1. Februar 1968 bis zum 28. Februar 1969 bin ich am Institut für Biophysik an der Universidad Austral de Chile tätig gewesen. Dort habe ich an histologischen Untersuchungen über die Struktur der Aduktor-Muskeln bei Balanus Psittacus mitgearbeitet.

Im Februar 1969 habe ich geheiratet und bin im März 1969, zusammen mit meiner Frau, nach Gießen zurückgekehrt mit

der Absicht, eine Dissertation anzufertigen.

Im April 1969 hat mir Prof. Dr. A. Schraub das Thema der vorliegenden Dissertation überlassen.

FOTO-DRUCK LENZ • 63 Gießen • Riegelpfad 32/Ecke Ludwigstraße
Telefon 0641 - 77449